

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2017.

Lucija Zovko

780/PI

**UTJECAJ SOLI NA  
PROTEOLITIČKE PROCESSE I  
OKSIDACIJU PROTEINA U  
TRAJNOM SUHOMESNATOM  
PROIZVODU**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju mesa i ribe na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc. Helge Medić, red. prof. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć više asistentice dr. sc. Nives Marušić Radovčić.

*Sveti Toma Akvinski zapisao je: „Nitko ne može biti zahvalan samome sebi, jer zahvalnost ide od pojedinca prema drugom čovjeku“. Stoga...*

*Hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Helgi Medić na podršci, ukazanom povjerenju i pruženoj prilici da u Laboratoriju za tehnologiju mesa i ribe izradim Diplomski rad. Posebno hvala višoj asistentici dr. sc. Nives Marušić Radovčić na bezrezervnom trudu i mnogobrojnim savjetima, bez kojih ovaj Diplomski rad sigurno nikad ne bih uspjela završiti.*

*Najviše hvala mojim roditeljima i sestri, kojima i posvećujem ovaj Diplomski rad. Hvala što ste mi omogućili studiranje i što ste sve ove godine bili uz mene, podržavali me i imali razumijevanja! Hvala Vam na beskonačnom strpljenju, razumijevanju i ljubavi...*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju mesa i ribe

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

### UTJECAJ SOLI NA PROTEOLITIČKE PROCESSE I OKSIDACIJU PROTEINA U TRAJNOM SUHOMESNATOM PROIZVODU

*Lucija Zovko, 780/PI*

**Sažetak:** Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj soli na proteolitičke procese i oksidaciju proteina u trajnom suhomesnatom proizvodu u tipu suha šunka. Uzorci su pripremljeni prema jednakoj tehnologiji prerade, osim u dijelu vremenskog trajanja procesa soljenja, koje je kod proizvodnje manje soljenih šunki bilo skraćeno s pet na tri tjedna. Ispitivanje je obuhvatilo određivanje udjela proteinskog, neproteinskog i hlapivog dušika po Kjeldahlu te indeksa proteolize. Budući da je formiranje karbonilnih spojeva označeno kao jedna od najistaknutijih modifikacija oksidiranih proteina, metodom DNPH iz uzoraka su kvantificirane ukupne količine karbonila. Dobiveni rezultati pokazuju kako kraće (manje) soljene šunke u prosjeku imaju veće udjele proteinskog, neproteinskog i hlapivog dušika te veći indeks proteolize što ukazuje i da su podložnije proteolitičkim procesima odnosno u prosjeku im je veća koncentracija karbonila.

**Ključne riječi:** suha šunka, sol, proteoliza, oksidacija proteina, karbonili

**Rad sadrži:** 40 stranica, 7 slika, 8 tablica, 72 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** *prof. dr. sc. Helga Medić*

**Pomoćpri izradi:** *dr. sc. Nives Marušić Radovčić, viša asistentica*

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Izv. prof. dr. sc. *Ksenija Marković*
2. Prof. dr. sc. *Helga Medić*
3. Izv. prof. dr. sc. *Sandra Balbino*
4. Doc. dr. sc. *Klara Kraljić* (zamjena)

**Datum obrane:** 28. 09. 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Food Technology  
Laboratory for Meat and Fish Technology

**Scientific area:** Biotechnical Sciences  
**Scientific field:** Food Technology

### EFFECT OF THE SALT ON PROTEOLYTIC PROCESSES AND PROTEIN OXIDATION IN THE DRY-CURED MEAT PRODUCTS

*Lucija Zovko, 780/PI*

**Abstract:** The aim of this work was to investigate the effect of salt on proteolytic processes and oxidation of proteins in the dry-cured meat product. The samples were prepared according to the same processing technology, except the salting process which was shortened from five weeks to three weeks. The study included the determination of protein, nonprotein and volatile nitrogen content by Kjeldahl method and the proteolysis index. Since the formation of carbonyl compounds is designated as one of the most prominent modifications of the oxidized proteins, the total amount of carbonyls is quantified from protein samples using the DNPH method. The obtained results show that shorter (less) salted hams have on average higher part of total, nonprotein and volatile nitrogen, and a higher proteolytic index, indicating that they are more susceptible to proteolytic processes and have a higher carbonyl concentration.

**Keywords:** dry-cured ham, salt, proteolysis, protein oxidation, carbonyls

**Thesis contains:** 40 pages, 7 figures, 8 tables, 72 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** *PhD. Helga Medić, Full professor*

**Technical support and assistance:** *PhD. Nives Marušić Radovčić, Senior Assistant*

**Reviewers:**

1. PhD. *Ksenija Marković*, Associate professor
2. PhD. *Helga Medić*, Full professor
3. PhD. *Sandra Balbino*, Associate professor
4. PhD. *Klara Kraljić*, Assistant professor (substitute)

**Thesis defended:** September 28 2017

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. SUHOMESNATI PROIZVODI.....	2
2.1.1. Pršut.....	3
2.1.2. Suha šunka.....	4
2.1.2.1. Tehnologija proizvodnje suhe šunke .....	5
2.1.3. Soljenje i salamurenje kao metode konzerviranja mesa.....	7
2.1.3.1. Utjecaj soli na kvalitetu suhomesnatih proizvoda.....	8
2.2.1. Oksidacija proteina.....	10
2.2.1.1. Proteinska karbonilacija kao izraz proteinske oksidacije.....	12
2.2.1.2. Uloga MCO .....	14
2.2.1.3. Uloga mioglobina.....	15
2.2.1.4. Uloga oksidirajućih lipida .....	15
2.2.3. Detekcija i kvantifikacija ukupnih karbonila: DNPH metoda .....	16
2.2.4. Proteolitički procesi i oksidacija proteina u suhomesnatim proizvodima.....	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	21
3.1. MATERIJAL.....	21
3.2. METODE .....	22
3.2.1. Određivanje proteinskog dušika i ukupnih proteina .....	22
3.2.2. Određivanje neproteinskogdušika .....	24
3.2.3. Određivanje ukupnih karbonila .....	24
3.2.4. Određivanje udjela natrijevog klorida.....	25
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	27
5. ZAKLJUČCI .....	33
6. LITERATURA.....	34

# 1. UVOD

Prema definiciji suha šunka je trajni suhomesnati proizvod od svinjskog buta s kožom i potkožnim masnim tkivom, bez nogice, bez repa, bez zdjeličnih kostiju, bez dodatka začina, koji se konzervira postupcima soljenja, dimljenja, sušenja i zrenja (Pravilnik, 2012). Iako je riječ o tradicionalnom hrvatskom suhomesnatom proizvodu, koji se na prostoru Slavonije, Baranje i zapadnog Srijema proizvodi duže od 300 godina (Kovačević i sur., 2017), o njemu u literaturi postoji malo podataka i njegova kvaliteta još uvijek nije standardizirana (Senčić i Butko, 2008) odnosno prilično je varijabilna u odnosu na kvalitetu nekih drugih hrvatskih prerađevina od svinjskih butova.

Čimbenici kvalitete butova su genotip svinja (pasmine, križanci, spol i dr.), tehnologija tova svinja (način držanja, hranidba, tjelesna masa, uvjeti smještaja i dr.) te postupak sa svinjama prije klanja dok se u čimbenike tehnologije prerade butova (šunki) ubrajaju način obrade butova, sastav salamure i načini salamurenja, način dimljenja (sušenja), mikroklimatski uvjeti tijekom prerade, uvjeti zrenja šunki i dr. (Senčić i Butko, 2008).

Tijekom proizvodnje šunke u svinjskom se butu događaju kompleksne promjene proteina i masti te dolazi do gubitka vode i porasta koncentracije soli što značajno utječe na kvalitetu gotovog proizvoda. Proteini i masti podliježu enzimskoj hidrolizi i oksidaciji koje zajedno s dehidratacijom pretvaraju svježi svinjski but u konzervirani proizvod visoke gastronomske i nutritivne vrijednosti (Marušić, 2013).

Proteoliza je značajan niz biokemijskih reakcija u tkivima pršuta, koje sudjeluju u stvaranju karakteristične ukupne arome, okusa i mirisa tijekom procesa prerade. Proteolitička aktivnost glavna je značajka endogenih enzimskih sustava u tkivima pršuta. Oni uz limitirajuće čimbenike (pH, koncentracija soli i vlage itd.), stvaraju nepovoljne uvjete za rast mikroorganizama, te je i aktivnost mikrobnih enzima unutar pršuta beznačajna (Molina i Toldrá, 1992). Oksidacija proteina primijećena je i u svježem mesu koje ima neki stupanj karboniliranja kao posljedicu oksidativnog stresa *in vivo*. Međutim, prerada potiče oksidaciju proteina tijekom koje kemijske modifikacije nanese specifičnim bočnim lancima amino kiseline i/ili okosnici peptida mogu dovesti do promjene fizikalnih svojstava proteina, uključujući fragmentacije, agregacije, gubitak topljivosti i funkcionalnosti te smanjenu osjetljivost na proteolizu (Xiong, 2000).

Cilj ovog rada je utvrditi utjecaj soli na proteolitičke procese i oksidaciju proteina u trajnom suhomesnatom proizvodu u tipu suhe šunke.



## **2. TEORIJSKI DIO**

### **2.1. SUHOMESNATI PROIZVODI**

Trajni suhomesnati proizvodi su proizvodi od različitih vrsta mesa u komadima s pripadajućim kostima, potkožnim masnim tkivom i kožom ili bez njih i dodatnih sastojaka, koji se konzerviraju postupcima soljenja, salamurenja, sušenja i zrenja, sa ili bez dimljenja, do stupnja primjerenog za konzumaciju bez prethodne toplinske obrade i mogu se puniti u odgovarajuće ovitke. Moraju posjedovati određena senzorna svojstva odnosno površina im treba biti suha i čista ili s mjestimičnim manjim naslagama plijesni u tankom sloju, a proizvodi s kožom moraju imati kožu svijetle do tamnosmeđe boje, bez zasjeka i drugih oštećenja. Također, moraju biti dovoljno osušeni, a vanjski izgled, izgled presjeka, miris, okus, konzistencija i tekstura moraju odgovarati zreloom proizvodu i vrsti mesa, a ako su dimljeni moraju imati miris i okus na dim. Kada je riječ o obliku, moraju biti što pravilnijeg oblika, uredno obrezanih rubova i bez zasjeka. Mesnati dijelovi moraju biti svijetlocrvene do tamnocrvene boje, periferni dijelovi mogu biti tamnije boje dok masno tkivo mora biti čvrsto i bijele boje, a površinski slojevi mogu imati žućkastu nijansu (Pravilnik, 2012).

Trajni suhomesnati proizvodi od svinjskog mesa proizvode se i stavljaju na tržište pod nazivima: pršut, suha šunka, suha lopatica, suha vratina, kraška vratina, budola, suha svinjska pečenica ili pod drugim nazivima (Pravilnik, 2012).

Pršut je proizvod od svinjskog buta s kostima, sa ili bez kože i potkožnog masnog tkiva, sa ili bez nogice, bez repa, sa ili bez zdjeličnih kostiju, sa ili bez dodatka začina, koji se konzervira postupkom suhog soljenja ili salamurenja sa ili bez dimljenja, podvrgnut procesima sušenja i zrenja u trajanju od najmanje devet (9) mjeseci, a koji se nakon sušenja i zrenja može stavljati na tržište otkošten (Pravilnik, 2012).

Suha šunka je proizvod od svinjskog buta, sa ili bez kože, bez nogice, zdjeličnih kostiju, križne kosti i repa ili potpuno otkošten, sa ili bez dodatka začina, koji se konzervira postupkom soljenja ili salamurenja, hladnog dimljenja, sušenja i zrenja. Dimljena šunka je proizvod od svinjskog buta s kožom i potkožnim masnim tkivom ili bez njih, s pripadajućim kostima ili bez njih i dodatnih sastojaka, koji se konzervira soljenjem ili salamurenjem, pasterizacijom i dimljenjem umjereno toplim ili toplim dimom. U proizvodnji dimljene šunke nije dozvoljena uporaba dodanih proteina (Pravilnik, 2012).

### 2.1.1. Pršut

Tradicija proizvodnje pršuta u priobalnom području Republike Hrvatske, u Istri i Dalmaciji, stara je vjerojatno isto koliko i u drugim mediteranskim državama, a tehnološki postupak proizvodnje najvećim se dijelom zasniva na iskustvu i tradiciji, koju su proizvođači prenosili iz generacije u generaciju. Posljednjih nekoliko godina, ovaj je proces znatno unaprijeđen čemu su pridonijela i znanstvena dostignuća koja su dala objašnjenja za veliki broj biokemijskih procesa u mesu, značajnih za stvaranje karakterističnog okusa i mirisa pršuta te poželjne konzistencije.

Prema Marušić (2013) pršut je trajni suhomesnati proizvod dobiven suhim soljenjem, ograničenom dehidracijom i postupnim kemijsko-enzimatskim transformacijama od svježeg svinjskog buta ka gotovom proizvodu koji se odlikuje izvrsnim senzornim osobinama-ugodnim mirisom i okusom te visokim sadržajem proteina.

Tijekom proizvodnje pršuta u svinjskom se butu događaju kompleksne promjene proteina i masti te dolazi do gubitka vode i porasta koncentracije soli što značajno utječe na kakvoću gotovog proizvoda. Proteini i masti podliježu enzimskoj hidrolizi i oksidaciji koje, zajedno s dehidratacijom, pretvaraju svježi svinjski but u konzervirani proizvod visoke gastronomske i nutritivne vrijednosti. Razgradnja, posebice intramuskularnih lipida te oksidacija slobodnih masnih kiselina vode ka formiranju brojnih hlapivih spojeva (aldehida, alkohola, ketona, alifatskih i aromatskih ugljikovodika, kratkolančanih masnih kiselina, estera, derivata furana i dr.) koji imaju presudnu ulogu u stvaranju karakteristične arome zrelog pršuta. S nutritivnog stajališta posebno je zanimljiv sadržaj slobodnih aminokiselina i masno-kiselinski sastav lipida pršuta. Zbog visoke razine slobodnih aminokiselina probavljivost mesa pršuta značajno je viša nego kod svježeg mesa dijelom zbog već razgrađenih proteina. Sastav intramuskularne masti pršuta ima povoljan odnos između zasićenih i nezasićenih masnih kiselina, a pršut sadrži i spojeve koji djeluju antihipertenzivno i antioksidativno (Marušić, 2013).

Klimatski uvjeti Dalmacije, osobito dalmatinske Zagore, izrazito pogoduju tradicionalnom načinu proizvodnje pršuta. Zbog toga su danas poznati Krčki, Dalmatinski, Drniški i Istarski pršut koji po svojim osobinama svakako pripadaju skupini pršuta vrhunske kakvoće. U osnovi proces proizvodnje pršuta uključuje soljenje prethodno obrađenog svinjskog buta, potom postupak sušenja i zrenja. Iako su navedeni principi zajednički u proizvodnji svih tipova pršuta, osnovna sirovina i neki tehnološki aspekti proizvodnje mogu se bitno razlikovati što dovodi do različitih organoleptičkih svojstava pršuta.

### 2.1.2. Suha šunka

U krajevima s hladnijom klimom, koja onemogućava prirodno sušenje svinjskih butova, korišteno je dimljenje pa su tako nastale različite vrste sušenih šunki. Dimljenje je proces koji je tradicionalno karakterističan za kontinentalni dio Hrvatske, odnosno Slavoniju i Baranju, gdje se, kao alternativa pršutu, proizvodi suha šunka. Konzervirajuće djelovanje dimljenja zasniva se na antioksidativnom i baktericidnom djelovanju dima. Također, dimljenjem dolazi do povećanja otpornosti površine dimljenih proizvoda prema djelovanju topline i vode. Važna uloga dimljenja je i dobivanje specifičnog mirisa i okusa mesa te zlatnožute boje mesnih proizvoda. Dim koji se koristi u industriji mesa nastaje sagorijevanjem usitnjenog drveta, najčešće strugotina bukve, hrasta ili drugih tvrdih drva. Kod dimljenja treba biti vrlo pažljiv budući da je temperatura sagorijevanja drveta u klasičnim pušnicama u domaćinstvima viša od 500 °C, pri čemu nastaje ugljični monoksid i kancerogeni spojevi. Zbog toga se u industrijskim uvjetima nastoji postići temperatura izgaranja do 300 °C (Kovačević, 2001).

Suha šunka (slika 1) trajni je suhomesnati proizvod, dobiven posebnim obrađivanjem i suhim soljenjem svinjskog buta te njegovim dimljenjem i zrenjem kroz određeno vrijeme, u specifičnim mikroklimatskim uvjetima Slavonije i Baranje. Na kraju proizvodnog procesa  $a_w$  suhe šunke mora biti niži od 0,93. Slanost šunke ovisi o količini dodane kuhinjske soli, ali i dužini sušenja i zrenja. Prevelika količina soli prikriva druge okuse šunki, a nedovoljna uzrokuje njihovu slabiju izraženost.



**Slika 1.** Domaće suhe šunke (Anonymous, 2014)

### 2.1.2.1. Tehnologija proizvodnje suhe šunke

Prema Senčiću, proizvodnja šunke tradicionalno je započinjala u kasnu jesen ili zimu, kada vladaju niske temperature, važne za sigurno usoljavanje mesa, a završavala je krajem ljeta ili početkom jeseni, kada završava zrenje toga proizvoda. Svinjski su se butovi jače usoljavali, kako bi se spriječilo njihovo kvarenje, zatim su se intenzivnije dimili hladnim postupkom, a na kraju su se, početkom ljeta, ostavljali na zrenje u prohladnim prostorima (Senčić, 2009).

Primjerice, Slavonska šunka proizvodi se više od 300 godina na području Slavonije, Baranje i zapadnog Srijema. Riječ je o prostoru s umjereno kontinentalnom klimom, a u dijelu godine kada se tradicionalno obavlja svinjokolja (studeni-veljača) temperature su niske i kreću se u rasponu 0,5-6,2 °C te je priprema butova i soljenje s minimalnim rizikom od mikrobiološkog kvarenja, dok je relativna vlažnost zraka visoka i kreće se oko 80-85%. Iako u tom razdoblju pušu sjeverni vjetrovi, sušenje se dodatno pospješuje višetjednim dimljenjem. Porast temperatura u ožujku i travnju poklapa se sa završetkom faze sušenja i početkom faze zrenja kada se šunke premještaju u komore za zrenje sa stabilnim uvjetima temperature i relativne vlažnosti, neovisno o vremenskim prilikama. Proizvodnja šunke traje ukupno 7-8 mjeseci kada završava zrenje šunke (Senčić, 2009).

Tradicionalna tehnologija za proizvodnju šunke uglavnom se sastoji od soljenja, dimljenja (uvjetno), odmaranja, sušenja i zrenja. Sam tehnološki postupak proizvodnje šunke započinje klanjem svinja. Nakon 24 sata hlađenja, butovi se primarno obrađuju, a faza prerade buta (hlađenje i obrada) traje oko 2 dana. Pošto se meso hladi dan i noć, salamuri se odnosno soli (do 6 tjedana). Prije soljenja bitno je istisnuti zaostalu krv iz bedrene arterije (*a. femoralis*) te iz svih ostalih vidljivo prokrvavljenih dijelova. Potrebna količina soli je 6-8% mase buta (0,6-0,8 kg/10 kg buta) (Senčić, 2009).

Tradicionalan način je suho soljenje, a po potrebi butovi se izvane i dosoljavaju. Može se koristiti i mokro salamurenje (s ispustom i tiskanjem/tiještenjem), pri čemu se od začina eventualno koriste češnjak, papar u zrnu, lovor tako da ih sa solju prokuha u vodi odnosno u salamuri. Sol ima inhibitorni učinak na rast nepoželjnih mikroorganizama te potiče ili inhibira aktivnost mišićnih enzima. Premalo soli u mesu omogućava razmnožavanje mikroorganizama i kvarenje šunki, dok višak soli maskira svaki drugi okus. Bakteriostatski učinak soli potpun je samo u kombinaciji s niskom temperaturom, te je zbog toga tijekom faze soljenja vrlo neophodna niska temperatura u prostoriji za soljenje.

Učinak soli na usporavanje razmnožavanja nepoželjnih mikroorganizama temelji se na snižavanju aktivnosti vode  $a_w$  u šunki. Nakon utrljavanja soli, butovi se ne otresaju već se slažu u bačve ili bazene. Na dno posude butovi se slažu mesnatom stranom okrenutom prema gore, a na njih se slažu butovi s kožom prema dolje, te se okreću svakih 7 dana. Tijekom soljenja butova u mesu se nakuplja sol, iz njega izlazi tekućina s otopljenim tvarima (tzv. eksudat), a šunka sadrži smanjenu količinu vode (Senčić, 2009). Nakon soljenja butovi se prešaju tako da se slože u redove između ploča i opterete. Faza prešanja traje 7-10 dana, potom se butovi isperu čistom vodom i ocijede, nakon čega su spremni za dimljenje, sušenje i zrenje (Kos i sur., 2015).

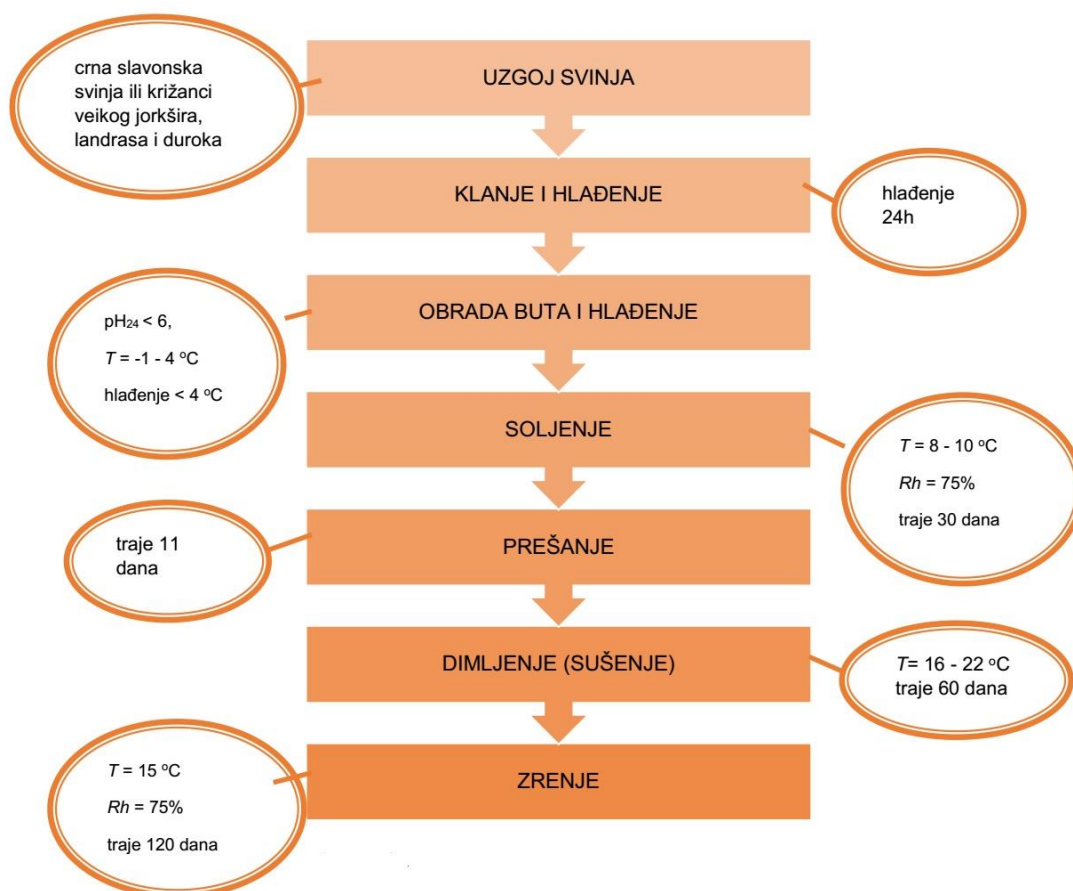
Slijedi kontrola mirisa mišićne mase ubadanjem tanke metalne igle uz glavicu bedrene kosti što dublje u mišićnu masu, kao i ispod kože skočnog zgloba. Pregledani butovi obrišu se suhom krpom i vješaju na metalne „S“ kuke koje se stavljaju iznad petne kvrge (*tuber calcanei*) ili drvene štapove u prostoriji za dimljenje (Senčić, 2009).

Nakon izjednačavanja temperature soljenih i ocijeđenih butova s temperaturom komore (prostorije) slijedi faza dimljenja (Kos i sur., 2015). Za postupak dimljenja vrlo je bitna vrsta i kvaliteta dima stoga se dimljenje treba odvijati na dimu od tvrdog bijelog drveta (bukva, jasen, grab – piljevina). Dimljenje bitno utječe na smanjenje masenog udjela vode u šunki te dolazi do povećanja koncentracije soli u proizvodu i osmotskog tlaka, koji u određenom trenutku usporava rast većine nepoželjnih mikroorganizama koji uzrokuju kvarenje mesa. Šunke treba sušiti tako da se voda iz unutrašnjosti postupno i trajno kreće prema površini (Senčić, 2009). Za proizvodnju šunki koristi se hladni postupak dimljenja ( $T=16 - 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), a dimljenje se odvija svakih nekoliko dana tijekom 60 dana, ovisno o masi šunki.

Tijekom sušenja i zrenja šunki smanjuje se aktivnost vode ( $a_w$ ) u mesu i ona postupno pada do vrijednosti 0,8 - 0,9 (Girard, 1992, Senčić, 2009). Rast većine bakterija inhibiran je kad je  $a_w$  manji od 0,91 (Senčić i sur., 2010). Limitirajući  $a_w$  za rast kvasaca je 0,88 - 0,95 a za plijesni 0,8-0,95 pa su plijesni jedina skupina mikroorganizama koja će se moći razvijati na kraju sušenja šunki (Senčić, 2009).

Nakon dimljenja u posebnoj, hladnoj i prozračnoj prostoriji ( $T \approx 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $Rh \approx 75\%$ ) odvija se zrenje šunki koje traje oko 120 dana. Tijekom procesa zrenja dolazi do razgradnje proteinskih i lipidnih sastojaka mesa buta pod utjecajem vlastitih enzima (kalpaini, katepsini). Na aktivnost tih enzima, između ostaloga, utječe količina kuhinjske soli i maseni udio vode, pri čemu je proteoliza intenzivnija u šunkama koje sadrže manje soli (Martin i sur., 1998).

Proces proizvodnje šunke traje oko 223 dana. Od buta mase od 10 kg dobije se nakon ovog vremena šunka mase oko 6,2 kg s 59-62% vode. Slika 2 prikazuje shemu tehnologije proizvodnje suhe šunke.



**Slika 2.** Shema tehnologije proizvodnje suhe šunke (Čeple, 2017)

### 2.1.3. Soljenje i salamurenje kao metode konzerviranja mesa

Soljenje i salamurenje su kemijske metode konzerviranja mesa koje se koriste u proizvodnji različitih mesnih proizvoda kao što su trajne kobasice, slanine, suhomesnati i drugi mesni proizvodi (Heinz i Hautzinger, 2007). Konzerviranje isključivo kuhinjskom soli naziva se soljenje, a salamurenje je konzerviranje solima za salamurenje koje se sastoje od smjese kuhinjske soli (obvezan sastojak salamure), nitrata, nitrita, ugljikohidrata, polifosfata, askorbata i drugih propisima dopuštenih sastojaka. Osim konzervirajućeg djelovanja, soljenje i salamurenje imaju i ulogu poboljšanja organoleptičkih svojstava mesnih proizvoda (okusa, boje, teksture i sl.). Meso se može soliti i salamuriti postupcima suhog, vlažnog ili kombiniranog salamurenja.

Pri suhom soljenju i salamurenju, sol ili smjesa za salamurenje utrljava se u komade mesa koji se slažu na postolje ili posudu, nakon čega se dodatno po površini posipaju odgovarajućom količinom soli. Postupak je spor, te se uglavnom zadržao u domaćinstvima. Vlažno salamurenje izvodi se potapanjem mesa u salamuru ili ubrizgavanjem salamure u mišiće i krvne žile mesa (tzv. brzi postupak salamurenja). Vlažno salamurenje potapanjem svodi se na potapanje komada mesa u salamuru u prikladnim posudama ili bazenima. U salamuri meso ostaje od nekoliko dana do nekoliko tjedana, ovisno o vrsti proizvoda, ali je vrijeme salamurenja potapanjem u svakom slučaju najmanje dvostruko kraće od vremena suhog salamurenja. U nastojanju da se proces salamurenja skрати, u suvremenoj industrijskoj preradi mesa prevladavali su postupci salamurenja ubrizgavanjem salamure u krvne žile i u mišiće, te kombinirano salamurenje. Za automatsko ubrizgavanje salamure u krvne žile lopatice (*a. brachialis*) i buta (*a. iliaca externa*), te za ubrizgavanje salamure u mišiće upotrebljavaju se uređaji s jednom ili više igala („Pickle injector”).

#### *2.1.3.1. Utjecaj soli na kvalitetu suhomesnatih proizvoda*

Kuhinjska sol (natrijev klorid, NaCl) bitan je sastojak mesnih proizvoda, budući da pridonosi povećanju sposobnosti vezanja vode i masti, formiranju boje, okusa i teksture te osiguranju mikrobiološke ispravnosti gotovog proizvoda (Kovačević i sur., 2011). Inhibira rast i razmnožavanje mikroorganizama, razara mioglobin pri čemu nastaje metmioglobin koji daje mrkosivu boju mesu, oduzima mesu vodu i djeluje na sposobnost vezanja vode, te uklanja strane mirise, utječe na pH na način da zaustavlja smanjenje pH ako je pH prije soljenja bio iznad 6,0; odnosno utječe na porast pH ako je soljenje izvršeno u fazi kada je pH bio ispod 6,0 (Toldra, 2002). Dodatkom 1% NaCl-a sposobnost vezanja vode povećava se za oko 20% a najveći porast ostvaruje se dodatkom 5% NaCl-a dok veće količine uzrokuju denaturaciju proteina što rezultira smanjenjem sposobnosti vezanja vode (Kovačević, 2014).

U visokim koncentracijama sol inhibira rast većine mikroorganizama, uključujući većinu onih koji uzrokuju kvarenje i smanjuje aktivnost enzima mesa. Štetno djelovanje kuhinjske soli na mikroorganizme tumači se prije svega povećanjem osmotskog tlaka, koji uzrokuje dehidraciju bakterijske stanice, te zatim toksičnom djelovanju iona klora, smanjenoj topivosti kisika u vodi i inhibitornom djelovanju NaCl na proteolitičke enzime mesa. Također, s povećanjem koncentracije NaCl u salamuri i salamurenim mesnim proizvodima smanjuje se aktivitet vode koji je jedan od esencijalnih čimbenika za razvoj mikroorganizama (Filipović, 2005), a smanjenjem aktiviteta vode  $a_w$  smanjuje se i potrebna razina sušenja odnosno smanjuje mogućnost dobivanja pretvrde šunke.

Potrebna količina soli je 6-8% mase buta (0,6-0,8/10 kg mase buta) (Girard i sur., 1992). Premalo soli u mesu omogućava razmnožavanje mikroorganizama i kvarenje šunki, dok višak soli maskira svaki drugi okus. Usoljavanje butova s manje soli (3-4%) nego li kod tradicionalnog soljenja (6-8%), zahtjeva nižu temperaturu i produženo vrijeme usoljavanja, koje traje onoliko koliko je potrebno da se u svim dijelovima buta osigura neophodna i ujednačena slanost.

Osim u svrhu konzerviranja, sol se koristi za poboljšanje organoleptičkih svojstava krajnjeg proizvoda. Ioni natrija i klora daju slani okus mesnim proizvodima, ali i naglašavaju njihovu karakterističnu aromu (HAH, 2014). Sol daje slanost mesu i uklanja strani miris mesa (Filipović, 2005). Soljenje dodatno uzrokuje povećanje topljivosti miofibrilarnih proteina mesa što dovodi do povećane sposobnosti vezanja vode, bubrenja mesa i na taj način poboljšava svojstva krajnjeg proizvoda koji je mekše teksture i povećane sočnosti (Desmond, 2006). Senzorska svojstva finalnog proizvoda koja se odnose na teksturu, kao što su mekoća pri žvakanju, lakoća narezivanja, odgovarajuća tvrdoća i elastičnost vrlo su važna s gledišta kvalitete trajnih suhomesnatih proizvoda, a izravno su povezana s procesom sušenja i dehidracijom (Krvavica i sur., 2012).

## **2.2. PROTEINI**

S prehrambenog aspekta, u pogledu zastupljenosti u hrani, najznačajniji predstavnik tvari s dušikom su proteini. U građi molekula proteina zastupljeni su kisik, vodik, ugljik i dušik, a u nekim i sumpor ili fosfor. Ovi elementi ulaze u sastav aminokiselina. Aminokiselinski sastav različitih proteina nije isti i predstavlja najvažniju karakteristiku svakog proteina, a služi i kao kriterij vrijednosti proteina u prehrani.

Prosječni kemijski sastav proteina je: ugljik (50-55%), vodik (6,5-7,3%), kisik (19-24%), dušik (15-18%) i sumpor (0-2,4%). Za razliku od ostalih sastojaka hrane, proteini sadrže ~16% dušika, pa se njihovo laboratorijsko utvrđivanje temelji na određivanju postotka dušika. Međutim, treba imati na umu da dušik u hrani nije sadržan samo u proteinima. Dio dušika nalazi se u nitratima, nitritima, amonijevim solima, slobodnim aminokiselinama, nukleinskim kiselinama, urei, kreatinu, tiaminu, fosfolipidima i drugim tzv. neproteinskim izvorima dušika (Koprivnjak, 2014). Prema definiciji EU, količina proteina u hrani računa se kao ukupni dušik (određen metodom po Kjeldahlu) pomnožen faktorom 6,25.

Metoda po Kjeldahlu potječe iz 1883. godine, a razvio ju je njemački pivar Johann Kjeldahl u



cilju određivanja proteina u ječmenom sladu. Postupak se odvija u trikoraka, i to: 1. vlažno spaljivanje uzorka hrane koncentriranom sumpornom kiselinom (tzv. digestija); 2. destilacija nastalog amonijaka vodenom parom i hvatanje kondenzata u suvišku klorovodične kiseline; 3. titracija preostalog dijela kloridne kiseline lužinom. Tijekom vlažnog spaljivanja dolazi do mineralizacije uzorka, pri čemu dušik u reakciji sa sumpornom kiselinom, uz zagrijavanje, prelazi u amonijev hidrogensulfat,  $(\text{NH}_4)\text{HSO}_4$ . U cilju potpune mineralizacije organskog dušika, otopini se dodaju sredstva za povećanje temperature vrelišta sumporne kiseline (npr. kalijev ili natrijev sulfat) te katalizatori oksidacije (npr. soli bakra i selen, kalijev permanganat, vodikov peroksid). Budući da je amonijev hidrogensulfat sol formirana od slabe baze i jake kiseline, amonijak se iz ove soli oslobađa dodatkom jake baze u suvišku (obično otopinom natrijevog hidroksida). Na tržištu postoji niz manje ili više automatiziranih uređaja za određivanje dušika i proteina po Kjeldahlu (Koprivnjak, 2014).

Prema položaju u mesu te topivosti proteini se mogu razvrstavati na: mišićne miofibrilarne proteine (nisu topivi u vodi, topivi u slabim otopinama soli), sarkoplazmatske (topivi u vodi) i stromatske ili vezivnotkivne (nisu topivi u vodi ni u slabim otopinama soli). Mišićni proteini su punovrijedni, dok proteini vezivnog tkiva imaju znatno manje esencijalnih aminokiselina. Kao glavni sastojak mišićnog tkiva, proteini igraju presudnu ulogu u mesnim proizvodima u pogledu osjetnih, prehrambenih i tehnoloških svojstava (Lawrie, 1998) i predmet su brojnih istraživanja fokusiranih na modifikacije nastale tijekom postmortalnih promjena, procesuiranja i skladištenja mesa i mesnih proizvoda.

### 2.2.1. Oksidacija proteina

Pojava oksidacije proteina u biološkim sustavima poznata je i izučavana već oko pedeset godina, dok je do unazad dvadeset godina uglavnom zanemarivana činjenica da su mišićni proteini iz hrane osjetljivi na reakcije oksidacije, što dovodi do potencijalnog oštećenja kvalitete mesa (Estévez, 2011).

Xiong (2000) navodi kako kemijske modifikacije nanosene specifičnim bočnim lancima aminokiseline i/ili okosnici peptida, mogu dovesti do promjene fizičkih svojstava proteina, uključujući fragmentacije, agregacije, gubitak topljivosti i funkcionalnosti te smanjenu osjetljivost na proteolizu.

Oksidativna modifikacija proteina je promjena izazvana reaktivnim intermedijatima slobodnih radikala ili njihovim krajnjim produktima. U procesu oksidativne modifikacije proteina mijenja se njihova struktura, što dovodi do izmjene funkcionalne aktivnosti. Reakcije

modifikacije strukture proteina pod djelovanjem slobodnih radikala odvijaju se u *in vivo* uvjetima i odgovorne su za fiziološki proces starenja, degradacije i obnavljanja proteina, kao i za regulaciju aerobnog i anaerobnog metabolizma.

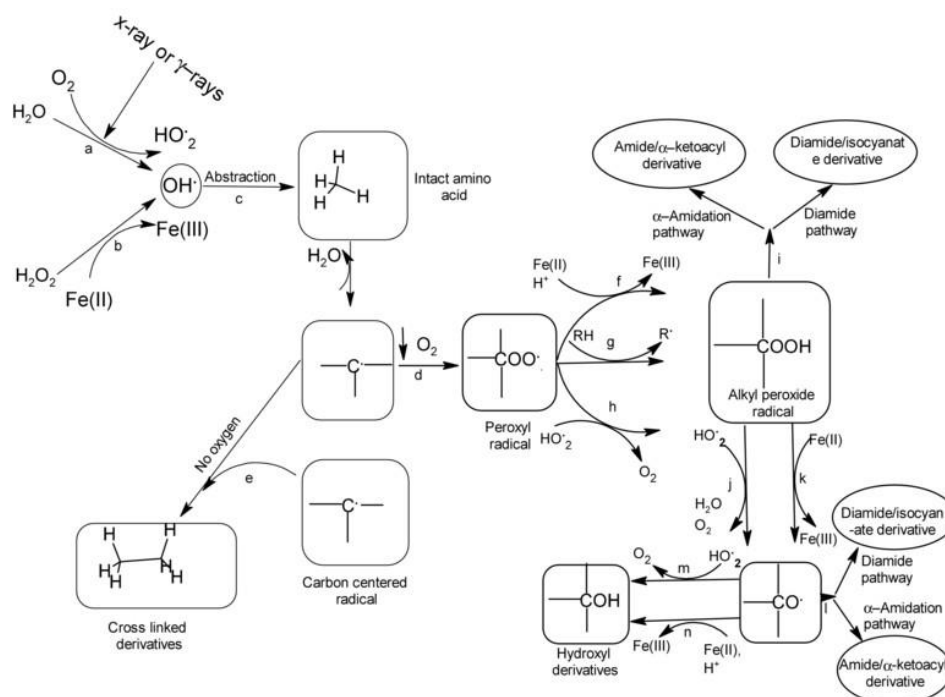
Tijekom oksidativne modifikacije proteini mijenjaju primarnu strukturu, kao posljedicu modifikacije pojedinih aminokiselina, ili kompletnog gubitka neke aminokiseline. Stupanj i tip efekata na proteinima u velikoj mjeri ovisi o vrsti radikala koji se u reakcijama oslobađaju kao i od dužine ekspozicije. Na temelju toga izvršena je podjela mogućih modifikacija: (1) modifikacija primarne strukture proteina kao posljedica: modifikacije pojedinih aminokiselina, gubitka pojedinih aminokiselina, agregacije proteina i fragmentacije proteina, (2) modifikacija sekundarne i tercijarne strukture proteina koja dovodi do promjene rastvorljivosti (jača hidrofobnost ili hidrofilnost) i promjena naelektriziranosti (ka pozitivnijem ili ka negativnijem). Promjene fizikalno-kemijskih svojstava proteina ogledaju se i u smanjenju termičke stabilnosti, promjeni viskoznosti i promjeni fluorescencije.

Kao jedna od najistaknutijih modifikacija oksidiranih proteina označeno je formiranje karbonilnih spojeva (Stadtman i Levine, 2003; Xiong, 2000). U stvari, kvantifikacija ukupnog iznosa proteinskih karbonila, koristeći dinitrofenilhidrazin (DNPH) tehnike (Estévez, 2011) vjerojatno je najčešća metoda za procjenu oksidacije proteina u mesu i biološkim sustavima (Estévez i sur., 2008b; Nystrom, 2005; Requena i sur., 2003; Tornväll, 2010).

Kao potencijalni inicijatori oksidacije proteina prepoznati su brojni reaktivni oblici kisika (engl. *Reactive Oxygen Species* - ROS) poput superoksida ( $O_2^*$ ), hidroperoksila ( $HO_2^*$ ) i hidroksil ( $HO^*$ ) radikala te druge neradikalne vrste poput vodikova peroksida ( $H_2O_2$ ) i hidroperoksida ( $ROOH$ ) (Estévez, 2011).

Proteini mesa osjetljivi su na reakcije oksidacije koje dovode do formiranja karbonilnih spojeva. Karboniliranje proteina mesa može biti inducirano koristeći nekoliko ROS sustava generiranja, uključujući prijelazne metale (engl. *Metalcatalyzed Oxidation* - MCO), mioglobinsku oksidaciju i lipid oksidacijske sustave (Decker i sur., 1993; Estévez i sur., 2009; Estévez i Heinonen, 2010; Park i sur., 2007; Soladoye, 2015).

Slika 3 prikazuje mehanizam oksidacije proteina.



**Slika 3.** Mehanizam oksidacije proteina (Soladoye i sur., 2015)

#### 2.2.1.1. Proteinska karbonilacija kao izraz proteinske oksidacije

Karbonilacija je ireverzibilna i neenzimska modifikacija proteina koja uključuje formiranje ostataka induciranih oksidativnim tlakom i drugim mehanizmima (Berlett i Stadtman, 1997). Karbonili (aldehidi i ketoni) mogu biti formirani u proteinima različitim načinima: (1) direktnom oksidacijom lanaca iz lizina, treonina, arginina i prolina (Requena i sur., 2001), (2) neenzimskom glikacijom u prisutnosti reducirajućih šećera (Akagawa i sur., 2005), (3) oksidativnim raspadom peptidne veze putem alfa amidiranja ili putem oksidacije lanaca glutamila (Berlett i Stadtman, 1997, Garrison, 1987) i (4) kovalentnom vezom za neproteinske karbonile poput 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) ili malondialdehid (MDA) (Soladoye i sur., 2015).

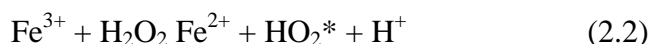
Između ova četiri načina, direktna oksidacija lanaca osjetljive aminokiseline koristi se kao glavni način za proteinsku karbonilaciju i kao glavni izvor direktnog oksidativnog napada na proteine (Shacter, 2000; Stadtman, 1990; Stadtman i Levine, 2000). Nadalje, ovo je jedini mehanizam koji dokazano doprinosi karbonilima iz mesnih proteina (Estévez i sur., 2009; Estévez i Heinonen, 2010).

Park i sur. (2007) izvijestili su o zanemarivom utjecaju razgradnje peptida na proizvodnju karbonila tijekom *in vitro* oksidacije mesnih proteina. Ostala tri mehanizma primjenjiva su na složene sustave prehrane, a relativni doprinos takvih načina karbonilacije mesnih proteina

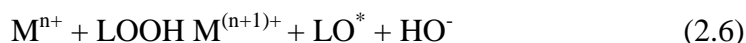
ostaje nepoznat. Formiranje karbonilnih derivata iz lizina, treonina, arginina i prolina, obično se pripisuje MCO sustavima (engl. *Metalcatalyzed Oxidation*) (Stadtman i Levine, 2003). Prema ovom mehanizmu, reducirani oblici prijelaznih metala reducirali bi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kako bi se formirali reaktivni intermedijari (hidroksil radikal) kroz Fenton reakciju (reakcija 2.1) u neposrednoj blizini osjetljive aminokiseline.



Prisutnost metalnih vezivnih mjesta u proteinima objašnjava da su aminokiselinski ostaci, smješteni na takvim lokacijama, jedinstveno osjetljivi na MCO od strane specifičnog mehanizma za to mjesto (Stadtman i Levine, 2003). U ovom slučaju, neki autori smatraju da je MCO ograničen na metalna vezivna mjesta proteina pri blagim oksidacijskim uvjetima, dok bi gotovo svi ostaci aminokiselina bili afektirani pri visokim koncentracijama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i metalnih iona poput Fe<sup>2+</sup>. Oksidirani oblici takvih iona poput Fe<sup>3+</sup> mogli bi generirati HO<sub>2</sub>\* radikale iz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kroz Fenton sličnu reakciju (reakcija 2.2) (De Laat i Gallard, 1999):



Mnogo je znanstvenih dokaza koji podržavaju da su oba oblika željeza, reducirani i oksidirani, u mogućnosti promovirati *in vitro* formiranje proteinskih karbonila tijekom ROS posredovane reakcije (Soladoye i sur., 2015). Zapravo, dva oksidacijska stanja pojedinih metalnih iona, poput iona željeza i bakra, koegzistirali bi u većini *in vitro* i bioloških sustava, gdje se ponašaju kao elektron donori (reducirani oblici) i elektron akceptor (oksidirani oblici). Ovaj redoks ciklus pruža važna katalitička svojstva, uključujući redukciju molekularnog kisika u radikal superoksidnog aniona (reakcija 2.3), koji se podvrgavaju uzastopnim reakcijama da bi nastao vodikov peroksid (reakcija 2.4) i hidroksil I (Haber-Weiss reakcija, 2.5) i raspad lipidnih vodikovih peroksida (LOOH) da bi se formirali peroksil i alkoksil radikali (reakcije 2.6 i 2.7) (Kanner, Hazan i Doll, 1988).



Kao posljedica MCO, treonin je konvertiran u alfa-amino-3-keto-butansku kiselinu, lizin u alfa-amino-adipin-polialdehid (AAS) i arginin i prolin u gama-glutamin-polialdehid (GGS). AAS i GGS originalno su korišteni kao biomarkeri za oksidativna oštećenja proteinima (Daneshvar i sur., 1997).

Prema načinu formiranja, prethodno opisanom od strane Stadtmana i Olivera (1991), a zatim i od Akagawe i sur. (2006), bočni lanci osjetljivih aminokiselina oksidativno deaminirani su u prisutnosti prijelaznih metala poput željeza i bakra. Reaktivne vrste napale bi amino skupinu iz bočnih lanaca aminokiseline izdvajanjem vodikova atoma od susjednog ugljika, vodeći prema formiranju proteinskog radikala s centralnim ugljikovim atomom. U sljedećem koraku, oksidirani oblici metalnih iona prihvatili bi usamljeni elektron od ugljikova radikala za formiranje imino grupe koja je spontano hidrolizirana da se dobije odgovarajući aldehidni ostatak (Akagawa i sur., 2006).

#### *2.2.1.2. Uloga MCO*

Decker i sur. (1993) otkrili su da je kombinacija metalnih iona ( $\text{Fe}^{3+}/\text{Cu}^{2+}$ ) s askorbinskom kiselinom učinkovita u poticanju oksidacije proteina i formiranju proteinskih karbonila. Njihovi rezultati pokazuju da nije nužno dodavanje vodikova peroksida, budući da prijelazni metali mogu generirati reaktivne vrste iz kisika i/ili postojećeg vodikova peroksida. Askorbinska kiselina stvara redoks ciklus reducirajući oksidiranu vrstu metalnog iona na reducirani par, koji, s druge strane, podupire formiranje ROS s kisikom i/ili vodikovim peroksidom. Također, utvrdili su da je  $\text{Fe}^{3+}$  učinkovitiji u poticanju oksidacije proteina i formiranju proteinskih karbonila nego  $\text{Cu}^{2+}$ . Bitno je spomenuti da metodologija korištena od strane navedenih autora (DNPH-metoda) daje procjenu ukupne količine proteinskih karbonila bez obzira na njihovu reaktivnost.

Soladoye i sur. (2015) navode kako su dvanaest godina nakon izvješća Daneshvara i sur. (1997), u proteinima hrane oksidirane MCO sustavima pronađen specifični protein karbonili AAS i GGS (Estévez i sur., 2009). Novijim istraživanjima pronađeno je da AAS i GGS sadrže 70% ukupnih proteina karbonila dobivenih iz umjereno oksidiranih mesnih proizvoda, što je kako navode Soladoye i sur. u skladu s izvješćima medicinskih istraživanja. Analizirajući takve specifične karbonile, Estévez i Heinonen (2010) otkrili su da  $\text{Cu}^{2+}$  ima veći učinak od  $\text{Fe}^{3+}$  u formiranju AAS i GGS iz miofibrilarnih proteina. Za razliku od željeza, bakar je u stanju vezati se za određena mjesta u proteinima poput kolagena, što dovodi do poboljšane i „zatvorene“ pro-oksidativne akcije prema bočnom lancu aminokiselina u takvim mjestima.

### 2.2.1.3. Uloga mioglobina

Osim prijelaznih metala, druge prirodne komponente mišića poput mioglobina (Mb) dokazano unaprjeđuju oksidaciju proteina i posebno proteinsku karbonilaciju. Zapravo, Estévez i Heinonen (2010) otkrili su da  $\text{H}_2\text{O}_2$  aktiviran mioglobinom unaprjeđuje nastanak AAS i GGS iz miofibrilarnih proteina u većoj mjeri nego  $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  i  $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ . Također, utvrđeno je da metmioglobin (MetMb) unaprjeđuje formiranje karbonila u većoj mjeri nego metal-katalizirani oksidirajući sustavi ( $\text{Fe}^{3+}$ /askorbinska kiselina/ $\text{H}_2\text{O}_2$ ). U daljnjem istraživanju, Park i Xiong (2007), potvrdili su da je MetMb oksidirajući sustav ( $\text{MetMb}/\text{H}_2\text{O}_2$ ) učinkovitiji u razgradnji individualnih aminokiselina poput lizina, više nego željezo-katalizirani oksidirajući sustav. U prisutnosti  $\text{H}_2\text{O}_2$ , mioglobin oblikuje hipervalentne vrste poput ferilmioglobina ( $\text{MbFe(IV)=O}$ ) za koje je dokazano da pokreću lipide i oksidaciju proteina. Vodikov peroksid može također uzrokovati otpuštanje željeza iz hem molekula i „ne-hem“ željezo bi kataliziralo reakcije oksidacije.

Promeyrat i sur. (2011) pokazali su da je mioglobin dobar prediktivni marker formiranja karbonila u mesnim sustavima, u kojima se ističe svojom ulogom učinkovitog unaprjeđivača karbonilacije proteina. Dok relativni doprinos svakog oblika željeza u oksidaciji proteina u mesu i mesnim proizvodima može ostati nedefiniran, hem i ne-hem željezo, kao i bakar, potencijalni su inicijatori formiranja karbonila u mesnim sustavima.

### 2.2.1.4. Uloga oksidirajućih lipida

Derivati lipida reaktivnih oksidirajućih vrsta, poput peroksil radikala ( $\text{ROO}^*$ ), također su potencijalni inicijatori karbonilacije proteina. Inkubacija miofibrilarnih proteina linoleinskom kiselinom i lipooksidazom, vodi do nekoliko biokemijskih promjena, uključujući formiranje karbonilnih spojeva, a utvrđena je i veza lipida i procesa oksidacije proteina tijekom *in vitro* oksidacije miofibrilarnih proteina metal-kataliziranim i lipid-oksidiranim sustavima. Dok proteinska karbonilacija zauzima mjesto u odsustvu lipida (Stadtman i Oliver, 1991), prateća pojava lipida i oksidacije proteina u mesnim sustavima sugerira prihvatljivu interakciju između oba fenomena (Estévez i sur., 2008). Ove interakcije mogu uključivati recipročni transfer reaktivnih i nereaktivnih vrsta između lipida i proteina. Prema stopi konstante, OH radikal će reagirati brže i s određenim proteinima poput albumina ( $8 \times 10^{10} \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) ili kolagena ( $4 \times 10^{11} \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), nego s nezasićenim lipidima poput linoleinske kiseline ( $9 \times 10^9 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Kao što je navedeno, rana degradacija lako oksidirajućih skupina koje sadrže sumpor u mišićnim proteinima, može se smatrati kao endogeni mehanizam zaštite od

ROS (Saiga i sur, 2003). I proteini i lipidi mogu se koristiti iz takvih antioksidans obrana. U stvari, Estévez i sur. (2008) promatrali su zaštitnu ulogu miofibrilarnih proteina protiv oksidacije lipida u emulziji ulja u vodi. Kada bi oksidativni stres prelazio antioksidativni kapacitet proteina, i proteini i lipidi podlegli bi oksidativnim oštećenjima manifestiranim kroz lančane reakcije slobodnih radikala. Nakon što oksidativna reakcija započne, mjerljive promjene ukazuju da bi oksidacija lipida napredovala brže nego oksidativna degradacija miofibrilarnih proteina (Estévez i sur., 2008).

### 2.2.3. Detekcija i kvantifikacija ukupnih karbonila: DNPH metoda

Postoji velik broj metoda za detekciju karbonilnih skupina proteina. Najčešće korištena metoda koristi 2,4-dinitrofenilhidrazin, koji u reakciji s karbonilnom skupinom daje stabilni 2,4-dinitrofenil hidrazon. Ta skupina apsorbira ultraljubičastu svjetlost, tako da se ukupni karbonilni udio proteina može odrediti spektrofotometrijom (Dalle-Donne i sur., 2003).

Metoda DNPH je rutinski postupak koji omogućuje kvantifikaciju ukupne količine karbonila iz uzorka proteina. Rezultati su naširoko korišteni kao opći indeks oksidacije proteina u mesu i mesnim proizvodima (Estévez i sur., 2008; Lund i sur., 2011).

Metoda se temelji na reakciji između DNPH s protein karbonilnim spojevima, čime se dobije 2,4-dinitrofenil (DNP) hidrazon proizvod koji prikazuje maksimalnu apsorpciju na oko 370 nm. Postupak uključuje simultano određivanje karbonilnih derivata i sadržaja proteina u uzorku.

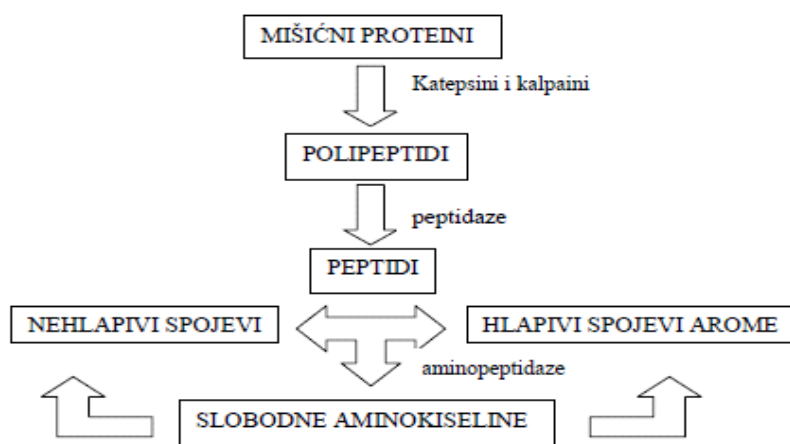
Koncentracija DNP hidrazona izračunava se mjerenjem izreagiranog DNPH spektrofotometrijski na temelju apsorpcije  $22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  na 370 nm. Koncentracija proteina određena je u kontrolnom uzorku (bez dodane DNPH) pri 280 nm upotrebom BSA kao standarda. Rezultati su obično izraženi kao nmol DNP hidrazona po mg proteina. Izvorni postupak razvijen je za analizu oksidativnog stresa u biološkim uzorcima, te je nakon toga korišten s manjim modifikacijama od strane prehrambenih znanstvenika.

Ove modifikacije uključuju tretiranje uzoraka otopinom klorovodične kiseline i acetona s ciljem uklanjanja potencijalnih interferencija supstanci kromofora (npr. hemoglobin, mioglobin i retinoid), i korištenje visoke ionske jakosti odbojnika kako bi se olakšala suspenzija posebnih proteina kao što su miofibrilarni proteini (Estévez i sur., 2008).

#### 2.2.4. Proteolitički procesi i oksidacija proteina u suhomesnatim proizvodima

Proteolitička aktivnost glavna je značajka endogenih enzimskih sustava u njihovim tkivima. Oni uz limitirajuće čimbenike (pH, koncentracija soli i vlage itd.), stvaraju nepovoljne uvjete za rast mikroorganizama, te je i aktivnost mikrobnih enzima unutar pršuta beznačajna (Molina i Toldrá, 1992).

Važnost proteolize kao čimbenika kakvoće pršuta, očituje se na nekoliko načina. Proteoliza izravno sudjeluje u formiranju konzistencije pršuta temeljem razgradnje miofibrilarnih proteina koji grade mišićnu strukturu. Stvaranjem peptida i slobodnih aminokiselina utječe na okus pršuta, a slobodne aminokiseline sudjeluju kao supstrat u budućim reakcijama, koje doprinose formiranju konačne arome i okusa pršuta, odnosno djeluju kao prekursori arome i okusa. Najvažnije proteolitičke promjene, koje sudjeluju u stvaranju posebnog okusa i arome pršuta visoke kakvoće, događaju se jedino u produženom procesu zrenja i kod pršuta niske koncentracije soli (Toldrá i Flores, 1998). Tijek proteolize u pršutu može jako varirati ovisno o tipu pršuta, količini endogenih proteolitičkih enzima i specifičnim preradbenim uvjetima. U osnovi, proteoliza teče prema slici 4.



**Slika 4.** Proteoliza u pršutu (Toldrá, 2002)

Proteolitički enzimi koji razgrađuju mišićno tkivo *post mortem*, su mišićne proteaze (Toldrá, 2002), a podijeljene su na endopeptidaze (proteinaze) i egzopeptidaze. Endopeptidaze hidroliziranjem miofibrilarnih proteina i stvaranjem proteinskih ostataka i polipeptida, sudjeluju u postmortalnom omekšavanju mišićnog tkiva (Dransfield, 1994). Egzopeptidaze stvaranjem slobodnih aminokiselina, sudjeluju u formiranju okusa i arome pršuta (Nishimura i sur., 1990). Najvažnije mišićne proteaze (endopeptidaze) su katepsini i kalpaini dok su



najvažnije mišićne egzopeptidaze podijeljene na amino-, karboksi-, di-, tri-, dipeptidil- i tripeptidil-peptidaze.

Neki problemi vezani za konzistenciju i organoleptičke osobine pršuta povezani su s intenzitetom proteolize, odnosno s prekomjernom proteolizom. Prekomjerna proteoliza u pršutu vezana je s genetskom osnovom, hranidbom i dobi svinja, što može značajno utjecati na aktivnost nekih enzima, osobito viša razina katepsinske aktivnosti. Posljedica je mekša konzistencija pršuta i lošija ocjena organoleptičkih osobina pršuta. Mekša konzistencija pršuta u pozitivnoj je korelaciji s povišenom rezidualnom aktivnošću katepsina B i nižom razinom soli (Parolari i sur., 1994) te povišenom rezidualnom aktivnošću katepsina B+L (García-Garrido i sur., 2000). Povišena koncentracija peptida i slobodnih aminokiselina, kao rezultat prekomjerne proteolize, može uzrokovati neprijatan okus pršuta.

Prema Martín i sur. (1998), povećanjem koncentracije soli smanjuje se stvaranje peptida. Prekomjerno stvaranje slobodnih aminokiselina tijekom procesa prerade pršuta, rezultat je intenzivne proteolize u mišićnom tkivu. Najčešće se u većoj količini nalaze alanin, leucin, valin, arginin, lizin, glutaminska i asparaginska kiselina. Konačna koncentracija ovisi o duljini procesa prerade i tipu pršuta. Ponekad se kao rezultat pojačane proteolize može javiti pojačana produkcija peptida, osobito molekulske mase od 26.000 do 87.000, koji uzrokuju stvaranje površinskog bijelog filma nareznoj površini pršuta (Toldrá i sur., 1990) ili formiranje vidljivih bijelih kristala tirozina unutar mišićnog tkiva pršuta.

Karbonilacija je ireverzibilna modifikacija proteina koja dovodi do nastanka proteinskih karbonila, aldehida i ketona, koji najčešće nastaju direktnom oksidacijom podložnih bočnih lanaca aminokiselina (Estèvez i Heinonen, 2010). Karbonilacija proteina može se dogoditi u odsutnosti lipida, ali prateća pojava oksidacije proteina i lipida u mesu sugerira interakciju između te dvije reakcije (Estèvez i sur., 2008). Stoga je važno odrediti i oksidaciju lipida tijekom istraživanja oksidacije proteina.

Na oksidaciju proteina i aminokiselina utječu i brojni tehnološki čimbenici, uključujući temperaturu, aktivitet vode i pH vrijednost (Estèvez i Heinonen, 2010). Uz proteolizu, proteini i oksidiraju pa je tako u pršutima, koji prolaze dugi proces proizvodnje, zbog duljeg i intenzivnijeg sušenja, utvrđena veća koncentracija karbonila nego u suhoj plečki.

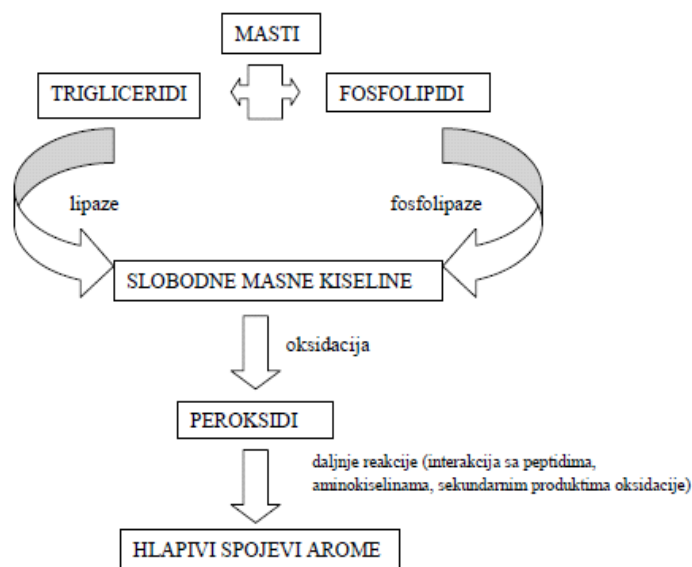
Lund i sur. (2011) izvijestili su o štetnim učincima oksidacije proteina na teksturu i nutritivnu vrijednost proizvoda od mesa. Veza između oksidacije proteina i narušene kvalitete proizvoda bazira se na korelaciji između proteinskih karbonila određenih DNPH metodom i procijenjene

kvalitete (Chan i sur., 2011, Zakrys i sur., 2009). Parametri teksture kao mekoća, sočnost i tvrdoća mogu biti promijenjeni oksidacijom proteina uslijed inaktivacije proteolitičkih enzima uključenih u mekšanje mesa i oksidativnih promjena miofibrilnih proteina i posljedično tome, njihove smanjene podložnosti proteolizi.

Nutritivna vrijednost proizvoda s oksidiranim proteinima smanjena je uslijed promjene profila aminokiselina, budući da formiranje proteinskih karbonila uključuje ireverzibilnu oksidativnu modifikaciju esencijalnih aminokiselina kao što su lizin, arginin i treonin. Stoga je proteinska karbonilacija mjera štetnog utjecaja oksidacije proteina na nutritivnu vrijednost proteina hrane (Estèvez, 2011).

Zbog smanjene aktivnosti proteolitičkih enzima kao rezultata inhibitornog djelovanja soli, proteolitički procesi su pod utjecajem dodataka NaCl. Također, primijećeno je da zrenje pršuta na povišenim temperaturama dovodi do pojačanog formiranja neproteinskih dušikovih spojeva i stoga utječe na tijek proteolize (Harkoussi sur., 2015). Anatomsko mjesto mišića unutar pršuta također igra važnu ulogu u vremenskom tijeku proteolize tijekom proizvodnje pršuta, zbog različite kinetike prijenosa soli i vode u svakom mišiću. Nedavno su Harkoussi i sur. (2014) kvantificirali proteolizu kroz indeks proteolize, u pet različitih svinjskih mišića, kao funkciju temperature i udjela vode te soli. Poznato je da proteoliza utječe na konačnu teksturu pršuta, te se smatra ključnim parametrom za dobivanje pozitivnih senzorskih svojstva na kraju procesa. Paralelno s tim, oksidacija lipida, koja je važan biokemijski proces u hrani tijekom prerade i skladištenja, utječe negativno, ali i pozitivno na njezinu kvalitetu (Jin i sur., 2012).

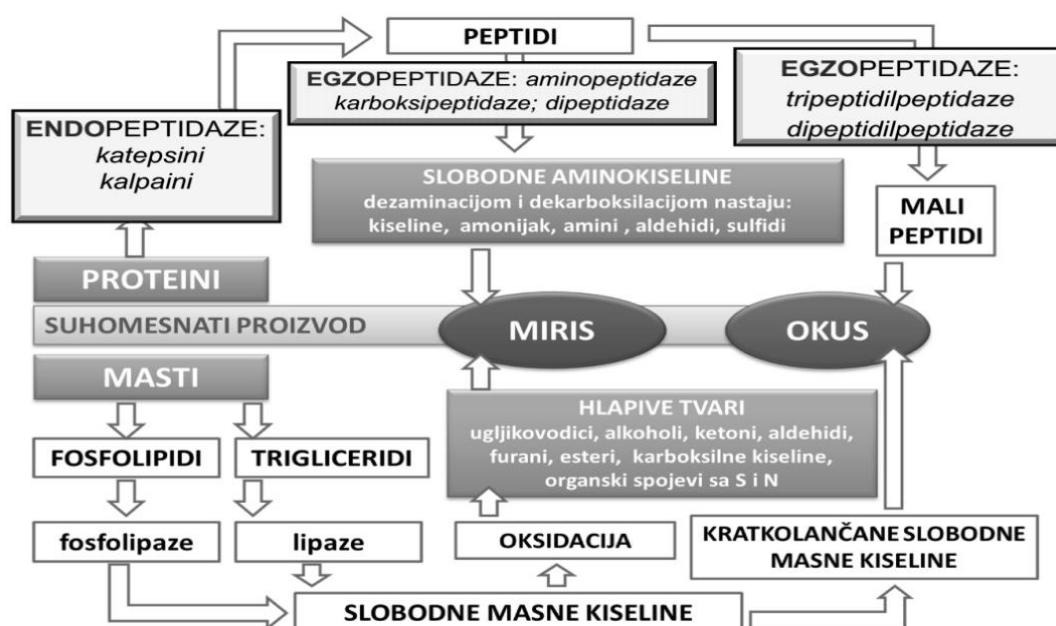
Oksidacija lipida također je bitan faktor i ima pozitivan učinak na razvoj tipične arome pršuta. Brojna istraživanja okarakterizirala su oksidaciju lipida u prehrambenim proizvodima ili ispitala učinak NaCl i temperature na njezin tijek (Harkoussi i sur., 2015). Slika 5 prikazuje tijek procesa lipolize u pršutu.



**Slika 5.** Lipoliza u pršutu (Toldrá, 1998)

Proteolitički indeks je dobar pokazatelj intenziteta proteolize, a određuje se fluorometrijski (Harkoussi sur., 2014). Njegove vrijednosti rastu tijekom tehnološkog procesa proizvodnje pršuta, a veće su u *m. biceps femoris* (BF) nego u *m. semimembranaceus* (SM) što se može objasniti većim udjelom vode u tom unutarnjem mišiću pa tako i jačom proteolitičkom aktivnošću (Harkouss i sur., 2015).

Slika 6 donosi shematski prikaz proteolitičkih i oksidacijskih procesa u pršutu.



**Slika 6.** Shematski prikaz proteolitičkih i oksidacijskih procesa u pršutu (Anonymous, 2017)

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJAL

Za istraživanje su korišteni uzorci standardno proizvedenih (n=4) i manje soljenih (n=4) turopoljskih šunki proizvedenih od svinja oba spola (nazimice i kastrati) autohtone turopoljske pasmine iz otvorenog uzgoja, hranjenih sa ili bez dodatka žira (tablica 1 ).

**Tablica 1.** Prikaz značenja oznaka uzoraka

Hranidba	Standardna smjesa		Uz dodatak žira	
	kastrat	nazimica	kastrat	nazimica
Spol				
Tehnologija				
- manje soljeno	94A	92A	76A	72A
- standardno	87A	85A	69A	65A

Svinje su bile uzgojene u gateru pokušališta Agronomskog fakulteta iz Zagreba u Šiljakovačkoj Dubravi, na način da je jedna skupina tovljenika u završnoj hranidbi (1,5 mjesec prije klanja), uz standardnu krmnu smjesu za svinje u tovu (ST-2), bila prihranjivana i žirom hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.), koji se nekada tradicionalno koristio u hranidbi turopoljskih svinja, dok je druga skupina tovljenika tijekom istog razdoblja bila hranjena samo ST-2 krmnom smjesom.

Prosječna dob i završna masa tovljenika prije klanja iznosila je  $18,15 \pm 1,4$  mjeseci i  $94,8 \pm 11,5$  kg. Klanje i klaonička obrada tovljenika obje skupine obavljani su prema standardnoj proceduri u odobrenom objektu (Klaonica 32 d.o.o., Velika Mlaka), a rasijecanje polovica i prerada mesa u jednom mesno-prerađivačkom objektu u okolici Zagreba (IGO-MAT d.o.o., Otruševac).

Za standardnu proizvodnju turopoljskih šunki obrađeni butovi ručno su natrljani smjesom soli za salamurenje (do 2,5% na ukupnu masu mesa,  $\text{NaNO}_2$  0,54-0,66%) i začina (crni papar, češnjak, začinska paprika), naslagani u velike PVC kace te ostavljeni na hladnom ( $T=4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) da se sole kroz pet (5) tjedana.

Nakon soljenja, butovi su hladno dimljeni u dimnoj komori ( $T=18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{RVZ}=80\%$ ) dimom bukovog drveta ukupno osam (8) puta, nakon čega su premješteni u komoru na sušenje i zrenje u kontroliranim uvjetima ( $T=12^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{RVZ}=75\%$ ).

Kod proizvodnje manje soljenih šunki primijenjena je jednaka tehnologija prerade, osim što je vrijeme soljenja šunki bilo skraćeno s pet (5) tjedana na tri (3) tjedna.

Uzorkovanje za kemijske analize obavljeno je kada su šunke bile stare oko 15 mjeseci. Distribucija uzoraka šunki prema spolu i hranidbenoj skupini svinja bila je jednaka.

## 3.2. METODE

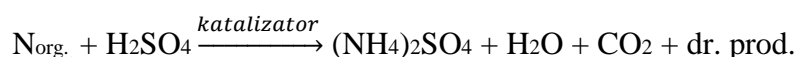
### 3.2.1. Određivanje proteinskog dušika i ukupnih proteina

Postupak se zasniva na Kjeldahlovom principu određivanja količine dušika prisutnog u uzorku. Dušik je karakteristični sastojak svih proteina i u njima ga nalazimo prosječno 16%. Po ovoj metodi količina ukupnih proteina određuje se indirektno iz količine dušika. Postupak se sastoji od tri faze: vlažnog spaljivanja/oksidacije; destilacije i titracije.

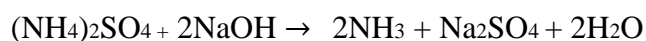
**Princip određivanja.** Uzorak je zagrijavan s koncentriranom sumpornom kiselinom uz dodatak katalizatora ( $\text{CuSO}_4$ ) i soli za povišenje vrelišta ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) prilikom čega je došlo do potpune oksidacije organske tvari ( $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$ ), a dušik koji je pri tome oslobođen u obliku  $\text{NH}_3$  sa  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dao je  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . U drugoj fazi određivanja (destilacija) djelovanjem lužine na amonij-sulfat oslobođen je amonijak koji je predestiliran vodenom parom u tikvicu s kiselinom poznate koncentracije. Višak kiseline određen je titracijom.

### Jednadžbe reakcija.

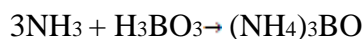
#### *Mineralizacija*



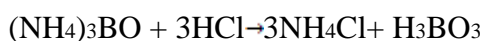
#### *Alkalizacija s NaOH u suvišku*



#### *Destilacija u bornu kiselinu u suvišku*



#### *Titracija amonijevog borata klorovodičnom kiselinom*



**Postupak u bloku za spaljivanje.** Epruvete za spaljivanje morale su biti čiste i suhe. Uzorak je vagan na listić aluminijske folije (2 g s točnošću  $\pm 0,01$  g), umotan i ubačen u epruvetu. U svaku kivetu dodane su 2 tablete Kjeldahl katalizatora i 14 mL konc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  kiseline i 5 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  te je lagano miješano dok se uzorak potpuno navlažio. Po završetku reakcije, stalak s epruvetama stavljen je u digestijsku jedinicu za mineralizaciju i uključenje sustav za odvod para. Prvih 10 minuta spaljivanje je išlo uz maksimalan protok vode (10 minuta) nakon čega se protok vode morao smanjiti na 50%. Mineralizacija je gotova nakon što je tekućina u epruvetama bistra i svjetlo zelene boje. Epruvete su zajedno sa stalkom uklonjene iz digestijske jedinice i ostavljene da se hlade zajedno s poklopcem do sobne temperature. Tada je u svaku epruvetu oprezno dodano 80 mL destilirane vode.

**Postupak destilacije.** Na postolje u destilacijskoj jedinici stavljena je Erlanmayer tikvica u kojoj se nalazilo 25 mL borne kiseline, zatim je podignuta u gornji položaj tako da je destilacijska cjevčica uronjena u otopinu. Kjeldahlova epruveta stavljena je na svoje mjesto i zatvorena su sigurnosna vratašca. Dozirano je 50 mL 40% NaOH u Kjeldahlovu epruvetu. Nakon destilacije koja je trajala 4 minute, dobiven je destilat zelene boje što je ukazalo na prisutnost amonijaka. Destilat je morao biti hlađen jer bi u protivnom (da je destilat topliji) došlo do gubitka amonijaka.

**Titracija kloridnom kiselinom.** Napunjena je bireta sa 0,2 N HCl i titrirana direktno u prihvatnu tikvicu. U završnoj točki boja otopine postala je blijedo ružičasta.

**Izračun.** Udio proteinskog dušika izračunat je prema formuli:

$$\%N = \frac{(T - B) * c(\text{HCl}) * 14,007 * 100}{m(\text{uzorak})[\text{mg}]} \quad (3.1)$$

gdje je:

T - utrošeni mL 0,2 M otopine HCl za titraciju uzorka

B - utrošeni mL 0,2 M otopine HCl slijepe probe

$c(\text{HCl}) = 0,2 \text{ mol/L}$

Iz dobivenog postotka dušika množenjem faktorom za meso dobiven je ukupni postotak proteina u uzorku

$$\%proteina = \%N * 6,25 \quad (3.2)$$

### 3.2.2. Određivanje neproteinskog dušika

Priprema uzorka za određivanje neproteinskog dušika provedena je kako su opisali Monin i sur. (1997). Neproteinski dušik ekstrahiran je iz homogeniziranog uzorka odvage  $2,5 \pm 0,05$  g upotrebom 25 mL deionizirane vode te centrifugiran. Zatim je dodano 10 mL 20%-tne trikloroctene kiseline (99% čistoće, Merck), miješano i ostavljeno 60 minuta da se stabilizira na sobnoj temperaturi. Centrifugirano je na 3500 okr/min tijekom 30 minuta, a supernatant je filtriran i 15 mL filtrata korišteno je za određivanje dušika prema metodi za ukupni dušik (HRN ISO 937:1999).

15 mL dobivenog filtrata stavljeno je u Kjeldahlovu epruvetu, dodane su 2 tablete katalizatora, 14 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  i 5 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Spaljivalo se 2 sata (polako pojačavajući-15 minuta na 1; 30 minuta na 3; 30 minuta na 5 te ostatak vremena na 10). Filtrat je ohlađen, dodano je 80 mL redestilirane vode te destilirano sa 50 mL NaOH s 25 mL borne kiseline. Nakon destilacije titrirano je s 0,1 M HCl-om (ako je jako mali utrošak može se staviti 0,02 M HCl).

**Izračun.** Maseni udio neproteinskog dušika u uzorku računat je prema formuli

$$w_n = \frac{1,4007(V_s - V_b) * c_s}{m} \quad (3.3)$$

gdje je:

$w_n$  - maseni udio dušika u uzorku (%)

$V_s$  - volumen, u mililitrima, 0,1 N klorovodične kiseline potreban za određivanje

$V_b$  - volumen, u mililitrima, 0,1 N klorovodične kiseline potreban za slijepu probu

$c_s$  - koncentracija klorovodične kiseline, 0,1 N

$m$  - masa, u gramima, testnog dijela uzorka.

### 3.2.3. Određivanje ukupnih karbonila

Priprema uzorka za određivanje ukupnih karbonila provedena je prema postupku koji su opisali Armenteros i sur. (2009). Izvagan je 1 g uzorka u falconicu (u duplikatu) i homogeniziran s 10 mL pirofosfatnog pufera (pH 7.4; 2 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ; 10 mM tris-maleat; 100 mM KCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM EGTA) na Ultra Turrax 30 sekundi (uzorci stavljeni u led). Uzorak je podijeljen na dva alikvota od 0,1 mL (u eppendorficu od 2 mL), u svaki je dodano 1 mL 10% TCA da perticipiraju proteini, izmiješano na Vortex-u i centrifugirano na 10000 rpm tijekom 5 min ( $2^\circ\text{C}$ ). Sljedeći korak bilo je izbacivanje supernatanta i to za:

*Pelet 1* → kvantifikacija proteina: dodano 1 mL HCl 2N

*Pelet 2* → mjerenje karbonila: dodano 1 mL 0,2% DNPH u HCl 2N

Dobiveni uzorci inkubirani su 1h na sobnoj temperaturi u tami, uz miješanje svakih 15 min na Vortex-u. Nakon toga precipitirani su sa 1 mL TCA 10%, promiješani na Vortex-u 30 sekundi i centrifugirani 10000 rpm tijekom 5 min (2°C). Zatim je izdvojen supernatant, a pelet isprana s 1 mL etanol/etil acetata (1:1), promiješana na Vortex-u i centrifugirana na 10000 rpm tijekom 5 min (2 puta). U sljedećem koraku pelet je otopljena u 1,5 mL natrijevog fosfatnog pufera 20 mM (pH 6.5) koji sadrži 6M guanidin hidroklorida, promiješana i centrifugirana na 10000 rpm tijekom 5 min da se uklone netopljivi fragmenti. Na ostavljenom supernatantu mjerena je absorbancija na sljedeći način:

*Pelet 1* → kvantifikacija proteina: mjeri se na 280 nm, koristeći BSA kao standard (0.5-2 mg/mL) u natrijevom fosfatnom puferu 20 mM (pH 6.5) koji sadrži 6M guanidin hidroklorid.

*Pelet 2* → mjerenje karbonila: mjeri se na 370 nm i izračunava koncentracija karbonila koristeći jednadžbu:

$$A = \xi \cdot M \cdot l \quad (3.4)$$

Rezultat je izražen kao nmol karbonila po mg proteina korištenjem adsorpcijskog koeficijenta za proteinske hidrazone  $\xi = 21.0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### Priprema baždarne krivulje

**Otopina standardnog proteina BSA  $2 \text{ mg mL}^{-1}$**  - otopljeno je 20 mg (0,02 g) u 10 mL fosfatnog pufera+guanidin hidroklorida. Napravljen je baždarni pravac prema:

BSA (mL)	Fosfatni pufer + guanidin hidroklorid (mL)	c BSA (mg/mL)
0	2	0 (SP)
0.5	1.5	0.5
1	1	1
1.5	0.5	1.5
2	0	2

#### 3.2.4. Određivanje udjela natrijevog klorida

Dokazivanje i određivanje udjela natrijevog klorida provedeno je titracijskom metodom po Mohru (AOAC, 1984) tj. iz volumena otopine  $\text{AgNO}_3$  utrošenog za titraciju uzorka



izračunavan je maseni udio natrijevog klorida u ispitivanom uzorku. U čašu od 100 mL izvagano je oko 2g (+/- 0,01 g) dobro usitnjenog i homogeniziranog uzorka, dodano 2-3 mL tople vode i miješano staklenim štapićem dok se dobila homogena smjesa. Smjesa je kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu od 100 mL (uz ispiranje čašice vodom), tikvica dopunjena destiliranom vodom do oznake, zatvorena čepom, dobro promiješana i držana u ključaloj vodenoj kupelji 15 minuta od trenutka kada je zakipio sadržaj tikvice. Tikvica je bila poklopljena tijekom ključanja uz povremeno dizanje čepa. Otopina u tikvici je ohlađena (ako je potrebno može se vodom dopuniti do oznake), promiješana i filtrirana preko filter papira. Ispitana je pH-vrijednost filtrata pH metrom (pH 7-10); u slučaju da filtrat reagira kiselo potrebno ga je neutralizirati otopinom natrijevog hidroksida. Od dobivenog filtrata otpipetirano je 25 mL filtrata u Erlenmeyerovu tikvicu, dodane su 2-3 kapi indikatora - zasićene otopine  $K_2CrO_4$  i titirano 0,1 M otopinom  $AgNO_3$  do prve promjene boje.

Udio NaCl izračunat je prema formuli:

$$m_{100}(\text{NaCl}) = 4 \times c(\text{AgNO}_3) \times V_s(\text{AgNO}_3) \times M(\text{NaCl}) \quad (3.5)$$

$$\text{udio NaCl (\%)} = \frac{m_{100}(\text{NaCl})}{m(\text{uzorka})} \cdot 100 \quad (3.6)$$

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Tablica 2 prikazuje udjele proteinskog dušika u ispitivanim uzorcima te izračunatu srednju vrijednost (AVG), standardnu devijaciju (SD) i koeficijent varijacije (CV) unutar dviju skupina ispitivanih uzoraka.

**Tablica 2.** Udjel proteinskog dušika u ispitivanim uzorcima

Hranidba Spol	Standardna smjesa		Uz dodatak žira		AVG	SD	CV
	Kastrat	Nazimica	Kastrat	Nazimica			
Proteinski dušik u kontrolnim uzorcima (%)	4,95	4,51	4,52	4,45	4,61	0,23	5
Proteinski dušik u manje soljenim uzorcima (%)	4,83	5,90	4,64	4,08	4,86	0,76	16

Kod kontrolnih uzoraka udjel proteinskog dušika kreće se u rasponu 4,45 do 4,95% uz prosječnu vrijednost 4,61%. Prosječno odstupanje od prosječne vrijednosti iznosi  $\pm 0,23$  ili 5%. U manje soljenim uzorcima u prosjeku je utvrđen veći udjel proteinskog dušika (4,86%), ali je unutar ove skupine utvrđeno i veće prosječno odstupanje od prosječne vrijednosti ( $\pm 0,76$  ili 16%).

Udjel ukupnih proteina u kontrolnim i manje soljenim uzorcima izračunat je na temelju prethodno izračunatih udjela proteinskog dušika množenjem faktorom 6,25 i ti su udjeli prikazani su u tablici 3. Udjel ukupnih proteina unutar ispitivanih uzoraka kreće se u rasponu 25,48 do 36,92% pri čemu treba naglasiti kako su i minimalni i maksimalni udjeli zabilježeni kod manje soljenih uzoraka.

**Tablica 3.** Udjel ukupnih proteina u ispitivanim uzorcima

Hranidba Spol	Standardna smjesa		Uz dodatak žira		AVG	SD	CV
	Kastrat	Nazimica	Kastrat	Nazimica			
Proteini u kontrolnim uzorcima (%)	30,94	28,19	28,24	27,78	28,79	1,45	5
Proteini u manje soljenim uzorcima (%)	30,32	36,92	28,99	25,48	30,43	4,79	16

Ranijim istraživanjima (Senčić, 2009; Krvavica i sur., 2006, Kos i sur., 2015) udjel ukupnih proteina u suhoj šunki (Slavonska šunka) utvrđen je u rasponu od 25 do 30%. U ovom istraživanju kod standardnih uzoraka udjel ukupnih proteina kreće se u rasponu 27,78 do 30,94% uz prosječnu vrijednost od 28,79%. Prosječno odstupanje od prosječne vrijednosti ukupnih proteina unutar ove skupine uzoraka iznosi  $\pm 1,45$  ili 5%.

Manje soljeni uzorci u prosjeku imaju veći udjel ukupnih proteina (30,43%), ali i veće prosječno odstupanje od prosječne vrijednosti ( $\pm 4,79$  ili 16%). Pojedinačni udjeli ukupnih proteina unutar skupine manje soljenih uzoraka kreću se u rasponu od 25,48 do 36,92%.

Sadržaj proteina manje soljenih šunki (30,43%) blizu je vrijednosti (29,95%) koju Senčić i sur. (2010) navode za Slavonsku šunku, nešto veći od vrijednosti (25,8-27,2%) koju za Srijemsku šunku navode Vuković i sur. (2005) ili Baldini i sur. (1993) za Parmski pršut (26,80%), a značajno manji od vrijednosti (40,73%) koju navodi Karolyi (2002) za Istarski pršut.

Tablica 4 prikazuje udjele neproteinskog dušika u ispitivanim uzorcima.

**Tablica 4.** Udjel neproteinskog dušika u ispitivanim uzorcima

Hranidba Spol	Standardna smjesa		Uz dodatak žira		AVG	SD	CV
	Kastrat	Nazimica	Kastrat	Nazimica			
Neproteinski dušik u kontrolnim uzorcima (%)	0,91	0,84	0,72	0,57	0,76	0,15	20
Neproteinski dušik u manje soljenim uzorcima (%)	0,85	0,95	0,87	0,82	0,87	0,06	6

Vidljivo je kako se udjel neproteinskog dušika unutar ukupno ispitivanog uzorka kreće u rasponu od 0,57 do 0,95%, te kako manje soljeni uzorci imaju veću prosječnu vrijednost neproteinskog dušika u odnosu na kontrolne uzorke.

Kod kontrolnih uzoraka udjel neproteinskog dušika zabilježen je u rasponu 0,57 do 0,91% uz prosječnu vrijednost od 0,76% i prosječno odstupanje  $\pm 0,15$  ili 20% od prosjeka. S druge strane, manje soljeni uzorci imaju značajno uži raspon izmjerenih udjela neproteinskog dušika (0,82 do 0,95%), veću prosječnu vrijednost (0,87%) te malo prosječno odstupanje od prosjeka ( $\pm 0,06$  ili 6%).

Tablica 5 sadrži podatke o udjelu hlapivog dušika u ispitivanim uzorcima koji se kreće u rasponu od 0,15 do 0,34%.

**Tablica 5.** Udjel hlapivog dušika u ispitivanim uzorcima

Hranidba Spol	Standardna smjesa		Uz dodatak žira		AVG	SD	CV
	Kastrat	Nazimica	Kastrat	Nazimica			
Hlapivi dušik u kontrolnim uzorcima (%)	0,28	0,15	0,15	0,16	0,19	0,06	34
Hlapivi dušik u manje soljenim uzorcima (%)	0,20	0,34	0,30	0,23	0,27	0,06	24

Vidljivo je kako je udjel hlapivog dušika veći u manje soljenim uzorcima, uz manje prosječno odstupanje od prosjeka (prosječna vrijednost 0,27% uz odstupanje  $\pm 0,06$  ili 24%). Hlapivi dušik u kontrolnim uzorcima kreće se u rasponu od 0,15 do 0,28% dok je prosječno odstupanje od prosjeka  $(0,19\%) \pm 0,06$  ili 34%.

Tablica 6 donosi podatke o indeksu proteolize u ispitivanim uzorcima. Temeljem utvrđenog većeg udjela neproteinskog i ukupnog dušika u manje soljenim uzorcima utvrđen je i veći prosječan indeks proteolize (18,14%) u odnosu na kontrolne uzorke (16,80%).

**Tablica 6.** Indeks proteolize u ispitivanim uzorcima

Hranidba Spol	Standardna smjesa		Uz dodatak žira		AVG	SD	CV
	Kastrat	Nazimica	Kastrat	Nazimica			
Indeks proteolize u kontrolnim uzorcima (%)	19,83	18,63	15,93	12,81	16,80	3,12	19%
Indeks proteolize u manje soljenim uzorcima (%)	17,60	16,10	18,75	20,10	18,14	1,70	9%

Indeks proteolize u kontrolnim uzorcima kreće se u rasponu 12,81 do 19,83% uz prosječno odstupanje od prosječne vrijednosti  $(16,80\%) \pm 3,12$  ili 19% dok se indeks proteolize u manje soljenim uzorcima kreće u rasponu od 16,10 do 20,10% uz prosječno odstupanje od prosječne vrijednosti  $(18,14\%) \pm 1,70$  ili 9%.

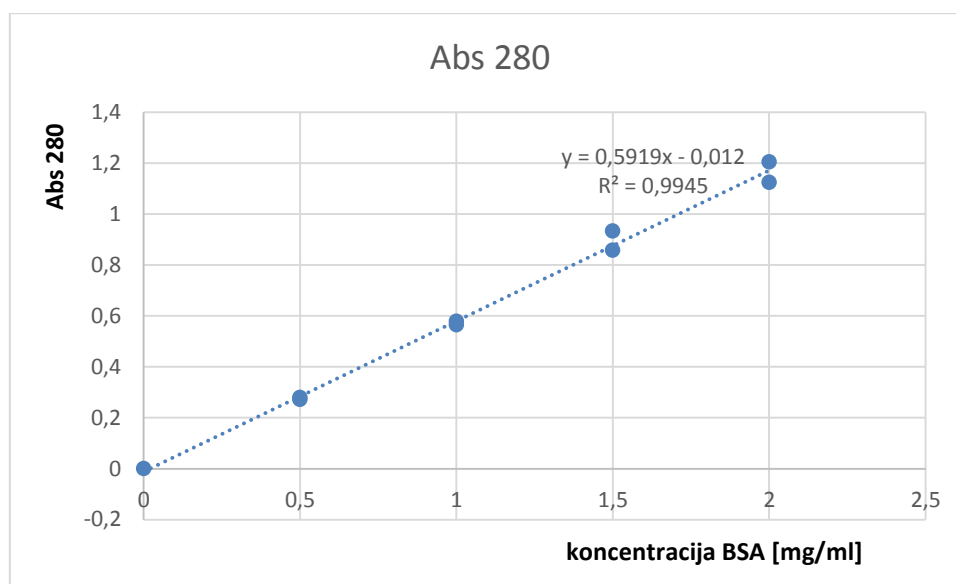
Očekivano indeks proteolize veći je u manje soljenim uzorcima što je u skladu s istraživanjima Martina i sur. (1998) koji su utvrdili da je proteoliza intenzivnija u šunkama koje sadrže manje soli, ali i sa istraživanjima Toldrá i Floresa (1998) koji su utvrdili da se najvažnije proteolitičke promjene u šunki događaju kod šunki niske koncentracije soli.

Sadržaj karbonila određen je spektrofotometrijski na 370 nm ( $\epsilon = 21.0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), a sadržaj proteina procijenjen mjerenjem apsorbancije uzorka na 280 nm.

Koncentracija proteina u svakom uzorku izračunata je na temelju baždarnog pravca dobivenog mjerenjem apsorbancije niza razrjeđenja BSA (od  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  do  $2 \text{ mg mL}^{-1}$ ).

Baždarnom pravcu BSA pridružena je odgovarajuća jednadžba pravca te je izračunat i koeficijent determinacije ( $R^2$ ) koji iznosi 0,994 (slika 7).

Što je koeficijent determinacije bliži 1, prilagodba linearnog modela podacima je bolja te se može zaključiti da dobiveni podaci veoma dobro opisuju stvarni sastav proteina u BSAi mogu se koristiti za identifikaciju proteina u uzorcima suhe šunke.



**Slika 7.** Baždarni pravac BSA

Koncentracija karbonila određena je prema formuli  $A = \epsilon \cdot M \cdot l$ , a rezultati su izraženi kao nmol karbonila po mg proteina korištenjem adsorpcijskog koeficijenta za proteinske hidrazone  $\epsilon = 21.0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

Tablica 7 donosi usporedne podatke o utvrđenim koncentracijama karbonila u kontrolnim i manje soljenim uzorcima.

**Tablica 7.** Koncentracija karbonila u ispitivanim uzorcima

Hranidba Spol	Standardna smjesa		Uz dodatak žira	
	Kastrat	Nazimica	Kastrat	Nazimica
Koncentracija u kontrolnim uzorcima (nmol karbonila/mg proteina)	26,96	27,10	22,24	26,33
Koncentracija u manje soljenim uzorcima (nmol karbonila/mg proteina)	28,10	25,93	27,40	26,34

Svega nekoliko istraživanja bavilo se utjecajem soli na nastanak proteinskih karbonila, ali bez konkretnih rezultata (Montero i sur., 2005, Shimizu i sur., 2009). Dodatak soli ima utjecaj na ionsku jakost okoline što dovodi do veće izloženosti miofibrilarnih proteina prooksidansima i stoga utječe na njihovu sklonost oksidaciji (Montero i sur., 2005). Oksidacija proteina je istraživana i u proizvodima od usitnjenog mesa i ustanovljeno je da je prerada utjecala na formiranje karbonila (Estèvez i sur., 2007, Sun i sur., 2010).

Iz tablice 7 vidljivo je kako je prosječna koncentracija karbonila veća u manje soljenim uzorcima (26,94 nmol karbonila/mg proteina) uz prosječno odstupanje  $\pm 0,99$  ili 3,7% dok je prosječna koncentracija kontrolnih uzoraka 25,66 nmol karbonila/mg proteina uz odstupanje  $\pm 2,30$  ili 8,98%.

U tablici 8 dani su podatci o postotonom udjelu soli (NaCl) u ispitivanim uzorcima.

**Tablica 8.** Udjel soli u ispitivanim uzorcima

Hranidba Spol	Standardna smjesa		Uz dodatak žira		AVG	SD	CV
	Kastrat	Nazimica	Kastrat	Nazimica			
Udjel NaCl u kontrolnim uzorcima (%)	10,94	7,96	8,99	8,46	9,09	1,30	14,36
Udjel NaCl u manje soljenim uzorcima (%)	5,81	5,9	8,00	6,42	6,53	1,01	15,53

Udjel NaCl u kontrolnim uzorcima kreće se u rasponu 7,96 do 10,94% uz prosječno odstupanje od prosječne vrijednosti (9.09)  $\pm 1,30$  ili 14,36% dok se u manje soljenim

uzorcima udjel NaCl kreće u rasponu od 5,81 do 8,00% uz prosječno odstupanje od prosječne vrijednosti  $(6,53) \pm 1,01$  ili 15,53%.

Udjeli soli ovisno o tipu trebali bi se kretati između 4 i 6% NaCl kod umjereno slanih šunki do 8 do 9% i više kod slanih šunki (Krvavica, 2006; Krvavica i Đugum 2007). Prema literaturnim podacima, prosječna količina soli u Slavonskoj šunki iznosi 8,37% (Senčić i sur., 2010), u Dalmatinskom pršutu 6,01-7,28% (Kos i sur., 2009), u Parmskom pršutu 4,2-6,4% (Benedini i sur., 2012; Lauterati i sur., 2014), u San Daniele pršutu 4,9-6,9% (Giovanelli i sur., 2016), u Toskanskome pršutu  $\leq 8,3\%$  (Lauterati i sur., 2014), u Iberijskom pršutu 6,24% (Andres i sur., 2005) i u Srijemskoj šunki 4,9-6,3% (Vuković i sur., 2005).

Udio soli općenito je viši što je u fazi soljenja dodano više soli, a trajanje soljenja duže. U ovom istraživanju u fazi soljenja dodani su isti udjeli soli, ali je faza soljenja u manje soljenih uzoraka trajala dva tjedna kraće. Dobiveni rezultati koji su niži kod manje soljenih uzoraka  $(6,53\% \pm 1,01)$  potvrđuju utjecaj duljine trajanja faze soljenja na udjel soli u suhoj šunki (ista količina NaCl uz dva tjedna kraću fazu soljenja rezultirala je nižim udjelima soli u suhoj šunki).

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih ispitivanja može se zaključiti:

1. Manje soljeni uzorci suhe šunke imaju veći udjel proteinskog dušika u odnosu na kontrolne uzorke ( $4,61\% \pm 0,23$  naspram  $4,86\% \pm 0,76$  kod kontrolnih uzoraka) te u prosjeku veći udjel ukupnih proteina ( $30,43\% \pm 4,79$ ).
2. Također, u manje soljenim uzorcima utvrđene su veće prosječne vrijednosti neproteinskog i hlapivog dušika.
3. Indeks proteolize veći je u manje soljenim uzorcima što je u skladu s ranijim istraživanjima koja su potvrdila da je proteoliza intenzivnija u šunkama koje sadrže manje soli, ali i da se najvažnije proteolitičke promjene u šunki događaju kod šunki niske koncentracije soli.
4. U kontrolnim uzorcima indeks proteolize kreće se u rasponu 12,81 do 19,83% uz prosječno odstupanje od prosječne vrijednosti ( $16,80\% \pm 3,12$  ili 19% dok se indeks proteolize u manje soljenim uzorcima kreće u rasponu od 16,10 do 20,10% uz prosječno odstupanje od prosječne vrijednosti  $(18,14) \pm 1,70$  ili 9%.
5. Pomoću DNPH metode određeni su udjeli karbonila koji su nešto veći u uzorcima s manje soli i njihova koncentracija u prosjeku iznosi 26,94 nmol karbonila/mg proteina.
6. Udjel NaCl u kontrolnim uzorcima kreće se u rasponu 7,96 do 10,94% uz prosječno odstupanje od prosječne vrijednosti  $(9,09) \pm 1,30$  ili 14,36% dok se u manje soljenim uzorcima udjel NaCl kreće u rasponu od 5,81 do 8,00% uz prosječno odstupanje od prosječne vrijednosti  $(6,53) \pm 1,01$  ili 15,53%.
7. NaCl usporava (koči) proteolizu zbog čega su manje soljeni uzorci šunke podložniji procesima proteolize.



## 6. LITERATURA

Akagawa, M., Sasaki, D., Ishii, Y., Kurota, Y. Yotsu-Yamashita, M., Uchida, K., Suyama, K. (2006) New method for the quantitative determination of major protein carbonyls,  $\alpha$ -aminoadipic and  $\gamma$ -glutamic semialdehydes: investigation of the formation mechanism and chemical nature in vitro and in vivo. *Chem. Res. Toxicol* **19**:1059-65.

Andres, A.I., Ventanas, S., Ventanas, J., Cava, R., Ruiz, J. (2005) Physicochemical changes throughout the ripening of dry cured hams with different salt content and processing conditions. *Eur Food Res Technol* **221**, 30-35.

Anonymous 1 (2015) Ništa bez domaće šunke, <<http://www.soundset.hr/vijesti/pozega/nista-bez-domace-sunke>>. Pristupljeno 24. svibnja 2017.

Anonymous 2 (2017) Tehnologija proizvodnje šunki i pršuta, <[http://studenti.ptfos.hr/Diplomski\\_studij/Autohtoni\\_mesni\\_proizvodi/.pdf](http://studenti.ptfos.hr/Diplomski_studij/Autohtoni_mesni_proizvodi/.pdf)>. Pristupljeno 12. lipnja 2017.

Benedini, R., Parolari, G., Toscani, T., Virgili, R. (2012) Sensory and texture properties of Italian typical dry-cured hams as related to maturation time and salt content. *Meat Sci.* **90**, 29-47.

Baldini, P., Bellati, M., Campanini, M., Pezzani, G., Camorali, G., Corbari, G., Reverberi, M. (1993) The typical Italian dry-cured ham: how to assess its quality? *Suinicoltura*, **34**, 6 – 37.

Berlett, B.S., Stadtman, E.R. (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **272**:20313-6.

Chan, D. S., Lau, R., Aune, D., Vieira, R., Greenwood, D. C., Kampman, E., and Norat, T. (2011) Red and processed meat and colorectal cancer incidence: Meta-analysis of prospective studies. *Plos One* **6**, e20456

Čeple, D. (2017) Promjena fizikalno-kemijskih svojstava Slavonske šunke tijekom soljenja. Diplomski rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek.

Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A. (2003) Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol. Med.* **9**:169-76.

- Daneshvar, B., Frandsen, H., Dragsted, L.O., Knudsen, L.E., Autrup, H. (1997) Analysis of native human plasma proteins and haemoglobin for the presence of bityrosine by high-performance liquid chromatography. *Pharm. Tox.*, **81**(5), 205-8.
- De Laat, J., Gallard, H. (1999) Catalytic Decomposition of Hydrogen Peroxide by Fe(III) in Homogeneous Aqueous Solution: Mechanism and Kinetic Modeling. *Environ. Sci. Technol.* **33**, 2726-2732.
- Desmond, E. (2006) Reducing salt: A challenge for the meat industry. *Meat Sci.* **74**, 188-196.
- Decker, E.A., Xiong, Y.L., Calvert J.T., Crum, A.D., Blanchard, S.P. (1993) Chemical, physical, and functional properties of oxidized turkey white muscle myofibrillar proteins. *J. Agric. Food Chem.* **41**:186-9.
- Dransfield, E. (1994) Optimisation of tenderisation, ageing and tenderness. *Meat Sci.* **36**, 105.
- Estévez, M. (2011) Protein carbonyls in meat systems: A review. *Meat Sci.* **89** (2011) 259-279.
- Estévez, M., Heinonen, M. (2010) Effect of phenolic compounds on the formation of  $\alpha$ -aminoadipic and  $\gamma$ -glutamic semialdehydes from myofibrillar proteins oxidized by copper, iron, and myoglobin. *J. Agric. Food Chem.* **58**:4448-55.
- Estévez, M., Ollilainen, V., Heinonen, M. (2009) Analysis of protein oxidation markers  $\alpha$ -aminoadipic and  $\gamma$ -glutamic semialdehydes in food proteins using liquid chromatography (LC) electrospray ionization (ESI)-multistage tandem mass spectrometry (MS). *J. Agric. Food Chem.* **57**:3901-10.
- Estévez, M., Morcuende, D., Ventanas, S. (2008) Determination of oxidation. In: Handbook of Processed Meat and Poultry Analysis, (Mollet, L. M. L., Toldra, F., ured.), CRC Press: Boca Raton, FL, 141-162.
- Estévez, M., Ventanas, S., Cava, R. (2007) Oxidation of lipids and proteins in frankfurters with different fatty acid compositions and tocopherol and phenolic contents. *Food Chem.* **100**, 55-63.
- Filipović, I. (2005) Stručnjaci odgovaraju. *Meso: prvi hrvatski časopis o mesu* [online] **VII**(2), 18-20, < <https://hrcak.srce.hr/21350>>. Pristupljeno 23. svibnja 2017.

- García-Garrido, J.A. , Quiles, R., Tapiador, J., Laque, M.D. (2000) Activity of cathepsin B, D, H and L in Spanish dry-cured ham of normal and defective texture. *Meat Sci.* **56**, 1-6.
- Garrison, W.M. (1987) Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. *Chem. Rev.* **87**:381-98.
- Giovanelli, G., Buratti, S., Laureati, M., Pagliarini, E. (2016) Evolution of physicochemical, morphological and aromatic characteristics of Italian PDO dry-cured hams during processing. *Eur. Food Res. Technol.* **242**,1117-1127.
- Girard, J. P. (1992) Technology of meat products, Ellis Horwood Limited, England.
- Harkouss, R., Astruc, T., Lebert, A., Gatellier, P., Loison, O., Safa, H., Portanguen, S., Parafita, E., Mirade, P.S. (2015) Quantitative study of the relationships among proteolysis, lipid oxidation, structure and texture throughout the dry-cured ham process. *Food Chem.* **166**, 522-530.
- Harkouss, R., Safa, H., Gatellier, P., Lebert, A., Mirade, P.S. (2014) Building phenomenological models that relate proteolysis in pork muscles to temperature, water and salt content. *Food Chem.* **151**, 7-14.
- Heinz, G., Hautzinger, P. (2007) Meat processing technology for small to medium-scale producers. Food and Agriculture Organization of the United Nations Regional Office for Asia and the Pacific. Bangkok.
- HRN ISO 1871:1999, Poljoprivredni prehrambeni proizvodi-Općenite upute za određivanje dušika Kjeldahlovom metodom (ISO 1871:1975).
- Jin, G., He, L., Zhang, J., Yu, X., Wang, J., & Huang, F. (2012). Effects of temperature and NaCl percentage on lipid oxidation in pork muscle and exploration of the controlling method using response surface methodology (RSM). *Food Chem.* **131**, 817-825.
- Kanner, J., Hazan, B. Doll, L. (1988) Catalytic "free" iron ions in muscle foods. *J. Agric. Food Chem.* **36** (3), 412–415. DOI: 10.1021/jf00081a002
- Karolyi, D. (2002) Kakvoća buta švedskog landrasa u tehnologiji Istarskog pršuta. Magistarski rad. Agronomski fakultet u Zagrebu, Zagreb.
- Koprivnjak, O. (2014) Kvaliteta, sigurnost i konzerviranje hrane, udžbenik iz kolegija Uvod u prehrambene tehnologije, Sveučilište u Rijeci, Rijeka.

Kos, I., Mandir, A., Toić, U. (2015) Dalmatinski pršut-Oznaka zemljopisnog podrijetla, Specifikacija, Udruga dalmatinski pršut, Trilj.

Kovačević, D. (2014) Tehnologija kulena i drugih fermentiranih kobasica, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek.

Kovačević, D. (2001) Kemija i tehnologija mesa i ribe, sveučilišni udžbenik, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek.

Kovačević, D., Mastanjević, K., Kušurin, I. (2017) Utjecaj različitih vrsta soli na proizvodni kalo i fizikalno-kemijska svojstva Slavonske šunke. *Meso: prvi hrvatski časopis o mesu* [online] **XIX**(3), 216-221, <<http://hrcak.srce.hr/183100>>. Pristupljeno 25.lipnja 2017.

Kovačević, D. (2014) Aditivi koji se koriste u industrijskoj proizvodnji fermentiranih kobasica. *Meso : prvi hrvatski časopis o mesu* **XVI** (3) 208-210.

Kovačević, D., Suman, K., Lenart, L., Frece, J., Mastanjević, K., Šubarić, D. (2011) Smanjenje udjela soli u domaćoj slavonskoj kobasici: utjecaj na sastav, fizikalno-kemijska svojstva, boju, teksturu, senzorska svojstva i zdravstvenu ispravnost. *Meso: prvi hrvatski časopis o mesu* [online] **XIII**(4), 244-249, <<http://hrcak.srce.hr/file/108062>>. Pristupljeno 23. svibnja 2017.

Krvavica, M. (2006) Čimbenici kakvoće pršuta. *Meso: prvi hrvatski časopis o mesu* [online] **VIII**(5), 279-290, <<http://hrcak.srce.hr/22421>>. Pristupljeno 23. svibnja 2017.

Krvavica, M., Đugum, J. (2006) Proizvodnja pršuta u svijetu i kod nas. *Meso: prvi hrvatski časopis o mesu* [online] **VIII**(6), 355-365, <<http://hrcak.srce.hr/22460>>. Pristupljeno 4. svibnja 2017.

Krvavica, M., Friganović, E., Kegelj, A., Ljubičić, I., Mioč, p.B. (2012) Sušenje i zrenje - temeljni tehnološki procesi u proizvodnji trajnih suhomesnatih proizvoda. *Meso: prvi hrvatski časopis o mesu* [online] **XIV**(2), 138-144, <<http://hrcak.srce.hr/86063>>. Pristupljeno 23. svibnja 2017.

Krvavica, M., Lukić, A., Vrdoljak, M., Đugum, J., Ćurić, D. (2007) Proteoliza mišićnog tkiva tijekom zrenja pršuta. *Meso: prvi hrvatski časopis o mesu* [online] **IX**(4), 221-229, <<http://hrcak.srce.hr/21287>>. Pristupljeno 4. svibnja 2017.

Laureati, M., Buratti, S., Giovanelli, G., Corazzin, M., Lo Fiego, D.P., Pagliarini, E. (2014) Characterization and differentiation of Italian parma, San Daniele and Toscano dry-cured hams: A multi-disciplinary approach. *Meat Sci.* **96**, 288-294

- Lawrie, R. A. (1998) The eating quality of meat. In: Meat science, 6. izd. (Lawrie R.A., ed.), Woodhead Publishing, Cambridge.
- Lund, M.N., Heinonen, M., Baron, C.P., Estèvez M. (2011) Protein oxidation in muscle foods: a review. *Mol. Nutr. Food Res.* **55**:83-95.
- Martín, L., Córdoba, J.J., Antequera, T., Timón, M.L., Ventanas, J. (1998) Effects of salt and temperature on proteolysis during ripening of Iberian ham. *Meat Sci.* **49**, 145-153.
- Marušić, N. (2013) Predstavljam vam Njegovo Visočanstvo PRŠUT. U: 100 (i pokoja više) crtica iz znanosti o prehrani (Štalić, Z., ured.), 79-80.
- Molina, I., Toldrá, F. (1992) Detection of proteolytic activity in microorganisms isolated from dry-cured ham. *J. Food Sci.* **57**, 1308-1310.
- Montero, P., Gimenez, B., Perez-Mateos, M., Gomez-Guillen, M.C. (2005) Oxidation stability of muscle with quercetin and rosemary during thermal and high-pressure. *Food Chem.* **93**, 17-23.
- Nishimura, T., Okitani, A., Rhue, M.R., Kato, H. (1990) Survey of neutral amino peptidases in bovine, porcine and chicken skeletal muscles. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 2769
- Parolari, G., Virgili, R., Schivazappa, C. (1994) Relationship between cathepsin B activity and compositional parameters in drycured hams of normal and defective texture. *Meat Sci.* **38**, 117-122
- Park, D., Xiong, Y.L. (2007). Oxidative modification of amino acids in porcine myofibrillar protein isolates exposed to three oxidizing systems. *Food Chem.* **103**:607-16.
- Pravilnik o mesnim proizvodima (2012) Narodne novine **131**, Zagreb.
- Pravilnikom o soli (2011) Narodne novine **89**, Zagreb.
- Promeyrat, A., Le Louët, L., Kondjoyan, A., Astruc, T., Santé-Lhoutellier, V., Gatellier, P., Daudin, J.D. (2011) Combined effect of meat composition and heating parameters on the physicochemical state of proteins. *Procedia Food Sci* **1**:1118-25.
- Requena, J.R., Groth, D., Legname, G., Stadtman, E.R., Prusiner, S.B., Levine, R.L. (2001) Copper-catalyzed oxidation of the recombinant sha (29-231) prion protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(13):7170-7175

- Saiga, A.I., Tanabe, S., Nishimura, T. (2003) Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *J. Agric. Food Chem.* **51**(12), 3661–3667. doi:10.1021/jf021156g
- Senčić, Đ. (2009) Slavonska šunka – hrvatski autohtoni proizvod, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek.
- Senčić, Đ., Butko, D. (2008) Kvaliteta slavonskih šunki na 3. nacionalnoj šunkijadi. *Meso: prvi hrvatski časopis o mesu* [online] **X**(3), 206-212, <<http://hrcak.srce.hr/30709>>. Pristupljeno 12. lipnja 2017.
- Senčić, Đ., Samac, D., Novoselec, J., Škrivanko, M., Kovačević, D. (2010) Fizikalno - kemijska i senzorska svojstva slavonske šunke. *Meso: prvi hrvatski časopis o mesu* [online] **XII**(2), 88-91, <<http://hrcak.srce.hr/61915>>. Pristupljeno 12. lipnja 2017.
- Shacter, E. (2000) Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Met Rev* **32**:307-26.
- Shimizu, Y., Kiriake, S., Ohtubo, S., Sakai, T. (2009) Effect of NaCl on protein and lipid oxidation in frozen yellowtail meat. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* **73**, 923–925.
- Soladoye, O.P., Juarez, M.L., Aalhus, J.L., Shand, P., Estévez, M. (2015) Protein Oxidation in Processed Meat: Mechanisms and Potential Implications on Human Health. *Comp. Rev. Food Sci. & Food Safety* Vol.**14**, 106-122.
- Stadtman, E.R., Levine, R.L. (2003) Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* **25**, 207-218.
- Sun, W.Q., Zhang, Y.J., Zhou, G.H., Xu, X.L., Peng, Z.Q. (2010) Effect of apple polyphenol on oxidative stability of sliced cooked cured beef and pork hams during chilled storage. *J Muscle Foods* **21**, 722–737.
- Toldrá, F. (1998) Proteolysis and lipolysis in flavour development of dry-cured meat products. *Meat Sci.* **49**, 101-110.
- Toldrá, F. (2002) Dry-cured meat products, Food and Nutrition press, inc. Trumbull, Connecticut, USA.
- Toldrá, F., Flores, M. (1998) The role of muscle proteases and lipases in flavour development during the processing of dry-cured ham. *CRC Critical reviews in Food Sci. & Nutr.* **38**, 331-352.

Vuković, I., Vasilev, D., Saičić, S.S., Tubić, M., Kričković, D. (2005) Važnije osobine sremske šunke proizvedene optimiziranjem tradicionalnog postupka proizvodnje. *Tehnologija mesa* **46**, 3-4, 110-114.

Xiong, Y.L. (2000) Protein oxidation and implications for muscle foods quality. In: Antioxidants in muscle foods (E.A. Decker, C. Faustman, & C.J. Lopez-Bote, eds.), (85–111), Wiley, New York.

Zakrys, P. I., O'Sullivan, M. G., Allen, P., & Kerry, J. P. (2009) Consumer acceptability and physiochemical characteristics of modified atmosphere packed beef steaks. *Meat Sci.* **81**, 720-725.